

心肌肌浆网膜钙泵调节蛋白 ——受磷蛋白的结构与功能

李翠凤 尚克进 凌启阁

(南开大学生物系生化教研室, 天津 300071)

提 要

受磷蛋白 (phospholamban, PHL) 是心肌肌浆网膜钙泵的调节蛋白。它是由五个相同亚基组成的分子量为 25000Da 的寡聚体膜蛋白。它对心肌钙泵的调节是通过磷酸化和脱磷酸化作用来实现的。磷酸化作用使它在 SDS-PAGE 上表现分子量的变化显示出其亚分子结构的复杂性。本文着重介绍了在心肌兴奋-收缩偶联过程中, 受磷蛋白的调节作用以及它的结构特征。

关键词 受磷蛋白, 肌浆网膜, 钙 ATP 酶 (Ca^{2+} -ATPase), 钙泵 (Ca^{2+} -Pump), 磷酸化作用

早在六十年代初就发现儿茶酚胺可以刺激心肌代谢, 引起细胞内 cAMP 浓度的增加。cAMP 的增加活化了依赖于 cAMP 的蛋白激酶 (cAMP-dependent protein kinase 以下称蛋白激酶 A), 使磷酸化酶激酶和糖原合成酶磷酸化, 从而导致糖酵解的显著增加。然而这并不能解释儿茶酚胺对心脏的刺激所引起心肌收缩力加强的机理。在进一步研究儿茶酚胺和它的第二信使 cAMP 对心肌兴奋-收缩偶联过程的影响时, M. Tada^[1] 等人发现蛋白激酶 A 可以刺激 Ca^{2+} -ATPase 的活性, 增加心肌肌浆网对 Ca^{2+} 的摄取。与此同时一个 22000Da 的磷酸蛋白形成。他们将心肌肌浆网膜与 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP, 蛋白激酶 A 一起温育时, 22000Da 磷酸蛋白的形成依赖于 cAMP, 其浓度范围在 0.1—10 $\mu\text{mol/L}$ 之间, 当存在 NaF (磷酸酶抑制剂) 时, 可使这一蛋白的磷酸化反应增加数倍^[2], 因此认为蛋白激酶 A 催化所形成的这一磷酸蛋白是心肌肌浆网膜 Ca^{2+} 泵的调节蛋白。以后又有几个实验室相继证实了当 β -肾上腺素能刺激心肌时, 确实伴随着一个磷酸蛋白的生成, 而

且这一蛋白是心肌肌浆网膜中可被蛋白激酶 A 磷酸化的主要蛋白。1975 年, Tada 和他的同事正式命名此蛋白为 phospholamban^[2], (拉丁文为 λαμβανειν = receive), 即 “phosphate receptor” 之意。作者建议译为“受磷蛋白”。以下均用 PHL 表示。从此 PHL 就作为心肌肌浆网膜钙泵调节蛋白引起人们的极大关注。经过近十多年的研究, 对 PHL 的基本理化性质, 亚基结构特点以及氨基酸组成等方面都有了比较多的了解。然而对于 PHL 与 Ca^{2+} -ATPase 相互作用机制的阐明还缺乏直接的实验证据。有待于进一步的研究。弄清这一点对从分子水平上彻底了解 β -兴奋剂增强心肌收缩的机理并获得具有调节活性的重组钙泵都有着十分重要的意义。

一、PHL 的理化性质

PHL 具有组织特异性, 存在于哺乳动物的心脏, 是肌浆网膜中可被蛋白激酶 A 磷酸化的主要蛋白。含 45% 的疏水氨基酸, 含量约占肌浆网膜总蛋白的 4—6%^[3]。可用有机溶剂和

SDS 提取,但是在这种强烈的条件下 PHL 虽保留其部分理化性质,但丧失了被蛋白激酶 A 催化形成磷酸酯蛋白的能力,改变了生理生化性质。所以采用低浓度的脱氧胆酸钠和非离子去污剂 Triton X-100 及 Octaethylene Glycol n-dodecyl ether ($C_{12}E_8$)都可以成功地将 PHL 从肌浆网膜上溶解下来,并得以进一步分离纯化^[3]。

最初,根据 ^{32}P 标记 PHL 在 Weber 和 Osborn 中性胶系统中的电泳迁移率,报告 PHL 的分子量为 22000Da^[2],而在 Laemmli 碱性胶系统中表观分子量为 27000Da,所以发现在不同条件下即磷酸化和非磷酸化,碱性胶和中性胶系统等,PHL 有不同的表观分子量 22000—27000Da^[3]。有人报告 PHL 是一种酸性脂蛋白^[4],等电点为 3.7—3.9,可与 Ca^{2+} -ATPase 紧密结合在一起, Ca^{2+} -ATPase 的等电点为 6.2,当用 Triton X-100 将 PHL 和 Ca^{2+} -ATPase 一起溶下来时,这个复合物的等电点为 4.2。也有人报告 PHL 在非磷酸化状态下等电点为 10,表现有很强的碱性。而在磷酸化状态下等电点为 6.7。PHL 的磷酸化作用改变了它的蛋白质构象,从而改变了它的等电点^[5]。从不同条件下 PHL 在 SDS-PAGE 中表观分子量的变化以及等电点的变化可以看出 PHL 表面电荷分布和结构的复杂性。

二、PHL 的亚基结构特点及磷酸化部位

开始认为 PHL 是一条 22000 Da 的单链蛋白质^[2],后来根据有 SDS 或 Triton X-100 存在时,100℃ 保温数分钟后再用 SDS-PAGE 检测时,22000Da 蛋白全部转变为 11000Da 蛋白的实验结果,Le Peuch 等人提出 PHL 是由二个相同亚基组成的二聚体^[4]。其后又有人相继报告过 PHL 为三聚体和四聚体。1985 年至 1986 年期间 Simmerman^[6], Jones^[5], Imagawa^[7], Suzuki^[8] 等人根据提纯的 PHL 在 SDS 中部分解离后的电泳行为以及磷酸化前后电泳迁移率的变化,提出 PHL 是由五个分子

量为 5000Da 的相同亚基组成。它的分子量为 25000Da。Suzuki^[8] 采用 PHL 单克隆抗体亲和层析法纯化的 PHL 在 1% SDS 溶液中 100℃ 加热 20s,然后经 SDS-PAGE,用免疫转移的方法可以检出分布均一的五条清晰的区带(图 1c)。Jones 等^[5]则采用巯基亲和层析(sulphydryl group affinity chromatography)法纯化的 PHL 在 SDS 溶液中加热部分解离后直接用考马斯蓝和银染法从 SDS-PAGE 中检出部分解离的 PHL 单体、二聚体、三聚体、四聚体和五聚体(图 1b)。当对已解离的 PHL 进行冷处理时,可恢复其原有的分子量。

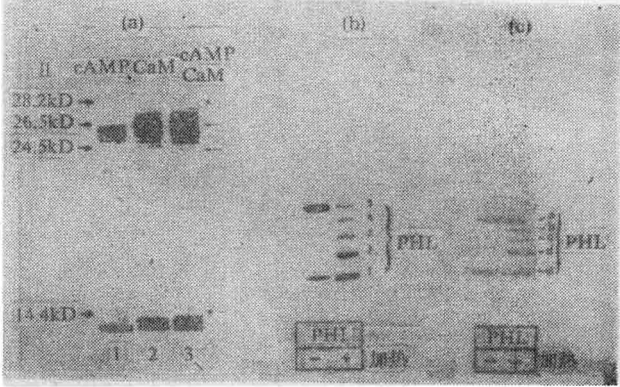


图 1 PHL 解离后的电泳行为

图 1a, b 及 c 分别摘自参考文献 [7], [5] 及 [8]

更有趣的是当 PHL 经蛋白激酶 A 磷酸化后其电泳迁移率发生变化。用放射自显影的方法可以清楚地观察到磷酸化了的 PHL 电泳迁移率较原来降低。表观分子量变化从 25000 到 27000Da (图 1a)。这一发现不但进一步证明 PHL 是由五个相同亚基组成的寡聚体蛋白,而且也显示出 PHL 复杂的亚分子结构特征。当五个亚基不同步磷酸化,使其产生五种不同的分子构象,在 SDS-PAGE 上出现五条不同的区带,表现出五种不同的表观分子量。众所周知,对于一个巨大分子量的蛋白质来说,一分子磷的参入并不足以引起分子量发生重大变化,然而一分子磷的参入却足以引起蛋白质分子构象的变化。PHL 正是这样,一个亚基的磷酸化导致其表面电荷分布的变化,从而使整个分子的构象发生改变,在电泳上表现出迁移率

阻滞现象。

现在越来越多的实验证明 PHL 不仅是蛋白激酶 A 的主要底物,而且也可被依赖于钙调蛋白的激酶^[9] (CaM-dependent protein kinase) 和依赖于 Ca^{2+} 及磷脂的蛋白激酶 C (Protein kinase C)^[10] 磷酸化。最近又有人报道 PHL 也可被依赖于环化鸟核苷酸的蛋白激酶 (cGMP-dependent protein kinase)^[11] 磷酸化。PHL 能被多种蛋白激酶磷酸化,不仅说明可能存在多种调节途径,而且由此可知 PHL 在心肌代谢中的重要作用。既然如此,那么各个蛋白激酶的磷酸化部位有什么不同?相互之间又是如何协调的呢? Simmerman 和 Jones 等于 1986 年^[6] 采用 Applied Biosystems Model 470A 气相蛋白顺序仪及逆相高效液相层析 (reverse-phase HPLC), 氨基酸顺序仪等配合蛋白酶水解, 肽谱及磷酸氨基酸分析等技术对 PHL 进行部分氨基酸顺序分析表明 PHL 的每个亚基都含有相同的氨基酸顺序。每个亚基至少有 20 个氨基酸残基形成可抵抗蛋白酶攻击的疏水区以稳定 PHL 的结构。这个疏水区以二性螺旋的形式存在,即每个亚基含有极性侧链基团的亲水部位向内,它们相互作用形成一个氢键网,强有力地维系和稳定了 PHL 的五聚体结构。同时每个亚基的疏水侧链基团则朝外,彼此形成了一个疏水的表面,使整个分子稳固地嵌入肌浆网膜的脂双层内。这样 PHL 便形成一个既有亲水内核又有疏水表面的跨膜结构(图2)。相反,每个亚基靠近 N-端的区域是蛋白酶敏感的亲水区,暴露于肌浆网膜外侧的胞浆中。蛋白激酶的磷酸化位点则位于这一区域。他们确定了靠近 N-端的部分氨基酸顺序为: Ser-Ala-Ile-Arg-Arg-Ala-Ser-Thr-Ile- Glu- Met-Pro-Gln-Gln-Ala-Arg-Gln-Asn- Leu - Gln - Asn-Leu-Phe-Ile-Asn-Phe- (Cys)- Leu- Ile - Leu-Ile-(Cys)-Leu-Leu-Leu, 其中 Ser⁷ 是蛋白激酶 A 的磷酸化位点, Thr⁸ 为依赖于钙调蛋白激酶的磷酸化位点。对于 PHL 氨基酸顺序及磷酸化位点的了解意味着将揭示它的结构与功能的关系。最近 Tada 和他的同事们利用 cDNA

的方法得到相同的结果^[3]。两种激酶分别作用在二个相邻的不同氨基酸残基上,并且它们的磷酸化具有叠加效应。而蛋白激酶 C 则没有很强的选择性,它既可磷酸化 Thr⁸,又可磷酸化另外二个丝氨酸: Ser¹ 和 Ser⁷^[12]。依赖于 cGMP 的蛋白激酶的磷酸化位点则与蛋白激酶 A 的相同 (Ser⁷),所以无论是对钙泵的刺激作用还是对 PHL 的磷酸化作用二种激酶均无叠加效应^[11]。

基于蛋白激酶 A 和依赖于钙调蛋白的激酶具有不同的磷酸化位点,五个相同亚基共有 10 个氨基酸可被磷酸化,所以当反应体系中同时存在二种激酶以及 Ca^{2+} , CaM, cAMP 和 [γ -³²P] ATP 时, PHL 各个亚基的不同步磷酸化导致在 SDS-PAGE 上出现迁移率逐渐降低的分布均一的 10 条区带(图 1a)。这一令人兴奋的结果不仅为上述推论提供了更直接的实验证据,同时表明在二种激酶的作用下,10 分子磷的不同步参入确使 PHL 产生 10 种不同的构象。这种由共价修饰所引起的构象变化必然会导致相应的功能变化。这正是目前深入探讨的主要课题之一。

由上可知, PHL 确实是一种名符其实的磷受体蛋白。通过被多种蛋白激酶的磷酸化来实现对心肌肌浆网膜钙泵的调节。然而这些蛋白激酶对 PHL 的磷酸化机制以及它们之间的关系还有待于进一步的研究。本文作者对 PHL 的磷酸化和脱磷酸化机制进行了探讨^[20],发现蛋白激酶 A 对 PHL 各个亚基的磷酸化为随机机制,而它的脱磷酸化却表现为正协同效应,二种机制的差别必定会有其特殊的生理意义。

三、PHL 结构模式的提出

继 Tada 首次提出 PHL 在心心肌浆网膜的存在和可能的生理作用之后, Jones 和他的同事们进行了大量卓越的研究,尤其在氨基酸组成和亚分子结构等方面。根据他们的实验结果提出了 PHL 的结构模式(图 2)。在跨膜部分的内部是由 Gln¹⁷, Asn¹⁸, Gln²⁰ 和 Asn²¹ 的侧链极性基团形成氢键网使 PHL 的五个亚基

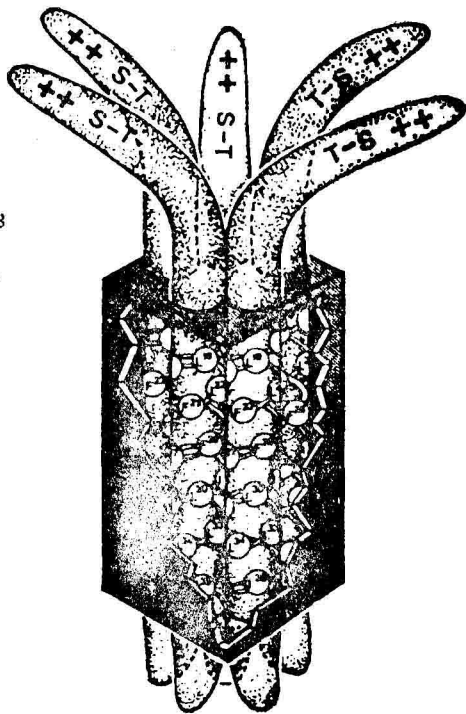
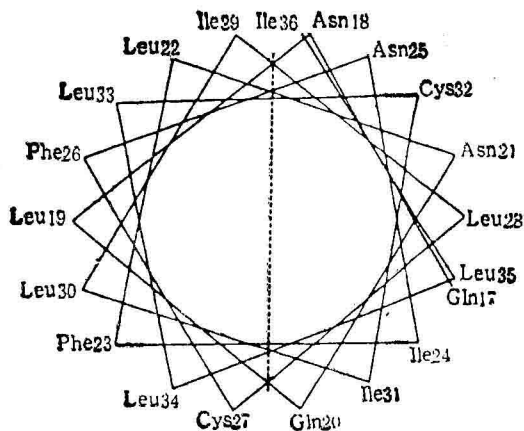


图2 PHL 的五聚体结构模式^[6]

T: Thr; S: Ser; ++ 代表两个 Arg

象发生变化, 在电泳中表现出滞留效应。同时也暗示出磷酸化解除了 PHL 对 Ca^{2+} -ATPase 的抑制作用, 使 Ca^{2+} -ATPase 的某些关键基团可以直接与 PHL 相互作用。二种模式基本一致, 都很好地体现出 PHL 作为 Ca^{2+} 泵调节剂的特征。

四、PHL 对肌浆网膜 Ca^{2+} -ATPase 的调节作用

在心肌兴奋-收缩偶联过程中, 肌浆网膜对

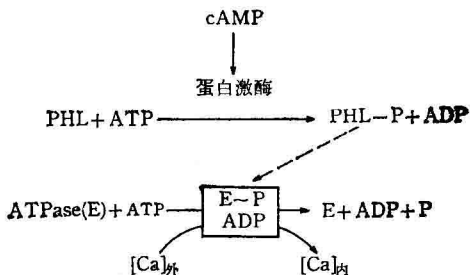


图4 PHL 对肌浆网膜 Ca^{2+} -ATPase 的调节^[1]

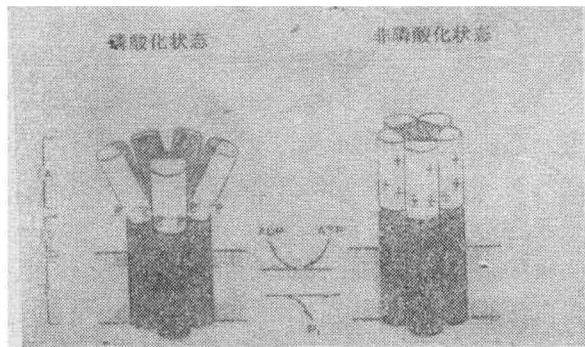


图3 PHL 磷酸化前后状态模式图^[3]

稳定地结合在一起, 类似于血型糖蛋白和细菌视紫红质的结构。而 Asn²⁵, Cys²⁷ 和 Cys³² 的极性侧链基团在分子的内部通过氢键与水分子结合提供了一个促溶解的水环境, 形成某种离子通道。跨膜区域的外部则完全由 Leu, Ile 和 Phe 贡献的疏水基团形成疏水的表面(图 2)。对于 PHL 磷酸化前后构象的变化, Tada 提出又一种模式(图 3)。这一模式解释了 PHL 的磷酸化改变了它的电荷分布, 从而导致分子构

钙的转移和贮存是关键一步。 Ca^{2+} -ATPase(EC 3.6.1.3) 分子量为 100kD 的单链蛋白存在于肌浆网膜并占总蛋白的 40%^[1,3]。作为钙泵,它水解 ATP 为 Ca^{2+} 的主动转运提供能量。所以肌浆网膜对 Ca^{2+} 的摄取和存贮是与 Ca^{2+} -ATPase 的活性紧密联系在一起的。Tada 等对 PHL 与 Ca^{2+} -ATPase 之间的调节作用进行了大量的研究^[1,3,13],认为在催化 ATP 水解促进 Ca^{2+} 转移过程中,ATPase 自身迅速地磷酸化和脱磷酸化,没有磷酸化的 PHL 与 Ca^{2+} -ATPase 结合发挥其抑制作用,而磷酸化的 PHL 却促进 ATPase 自身磷酸化这一限速反应,使 Ca^{2+} 的转移增加^[1](图 4)。最近 Fowler 等^[19]采用磷光极化(phosphorescence polarization)的方法从动力学角度研究了 PHL 对 Ca^{2+} -ATPase 的调节,也证明 PHL 的磷酸化解除了对 Ca^{2+} -ATPase 的抑制作用。

1986 年 Wang 和 Suzuki^[8,14]成功地制备了 PHL 的单克隆抗体。他们用牛心肌浆网膜与单克隆抗体一起温育时发现单抗可以阻断蛋白激酶 A 和内源依赖于钙调蛋白激酶对 PHL 的磷酸化作用。单抗同时也刺激钙泵活性显著增加。为证明 PHL 是心肌钙泵调节蛋白提供了强有力的证据。此外还发现单抗也可以阻断内源磷酸酶对已磷酸化 PHL 的脱磷酸化作用。由此他们认为 PHL 的抗体结合部位在胞浆一侧靠近磷酸化位点的部分。由于抗体与 PHL 结合所诱导的构象变化类似于磷酸化作用所引起的变化,所以单抗对钙泵活性的刺激类似于磷酸化所引起的刺激。鉴于单抗可以阻断 PHL 的磷酸化和脱磷酸化作用,他们推测有二种可能性:其一,由单抗所诱导的 PHL 构象变化使磷酸化部位不能接近蛋白激酶和内源磷酸酶,因而阻断了它的磷酸化和脱磷酸化作用。另一种可能性则是 PHL 的磷酸化位点局限于一个很小而又非常接近抗体结合部位的区域,所以单抗与 PHL 的结合起到了物理屏障的作用,使蛋白激酶和磷酸酶均不能与 PHL 相互作用。这些结果都充分证明了 PHL 磷酸化作用及其所诱导的构象变化是调节控制心肌钙泵

活性所必需的。然而 PHL 的磷酸化是受多种因素影响的。Wang 和 Suzuki^[15]采用单抗亲和层析法纯化的 PHL,由于使用了不同浓度的去污剂多次洗涤除去了与 PHL 结合的磷脂,制得高纯度的 PHL,但是磷的参入量却很低,用蛋白激酶 A 磷酸化时仅能达到 1—1.5 克分子磷/克分子蛋白。而粗膜状态存在的 PHL 磷的最大参入量却可达到 5 克分子磷/克分子蛋白。当他们把纯化过程中的漏出液除掉去污剂回加至反应体系中时,磷的参入量几乎恢复至粗膜水平^[15]。经鉴定这种内在的影响 PHL 磷酸化的因子为磷脂。当在提纯的 PHL 磷酸化反应体系中分别人为地加入各种磷脂(PI, PS, PC, PE)均可不同程度地促进 PHL 的磷酸化反应。其中以磷脂酰肌醇(PI)尤为显著,可达到 5 克分子磷/克分子蛋白。最近 Jakab 等也得到类似的结果^[16]。如果将各种磷脂等比例混合后加入反应体系却不能使 PHL 的磷酸化达到膜水平。这不仅说明自然状态下的 PHL 是嵌在 PI 丰富的磷脂环境中,也说明正确的磷脂微环境对于钙泵调节的重要性。

在心肌肌浆网膜中还存在有内源 PHL 磷酸酶。这种磷酸酶是通过对 PHL 的脱磷酸化作用来参与对钙泵的调节。Kranias 等^[17]已从狗心肌浆网膜中分离纯化了此磷酸酶。然而生命的调节是极其微妙的。最近 Lyer 等^[18]又从鼠心胞浆中发现了一种抑制剂-1。它可以抑制 PHL 的脱磷酸化作用。此抑制剂为一种小的蛋白质。也可被蛋白激酶 A 磷酸化,而且只有磷酸化后才表现对磷酸酶的抑制作用。因此认为蛋白激酶 A 在磷酸化 PHL 的同时也磷酸化了磷酸酶抑制剂-1。磷酸化的抑制剂-1抑制了 PHL 的脱磷酸化作用。这样就象双保险一样使磷酸化的 PHL 维持在一定水平,从而增加了钙向肌浆网膜内的转运。这种高度协调统一的调节机制维持着动物体心脏的正常搏动。

参 考 文 献

- 1 Tada M, Katz A M. *Annu Rev Physiol*, 1982; 44: 401
- 2 Tada M, Kichberger M A, Katz A M. *J Biol Chem*,

固氮酶反应中 ATP 驱动的电子传递*

吴也凡 曾 定

(厦门大学生物系, 厦门 361005)

提 要

本文通过分析 Mg-ATP 与铁蛋白相互作用的物理化学行为, 探讨了 Mg-ATP 在铁蛋白上的可能结合部位以及 Mg-ATP 的水解与电子传递的偶联关系。

关键词 铁蛋白, Mg-ATP, 电子传递

关于固氮酶作用机理的研究, 还存在着这样一些令人困惑的问题: Mg-ATP 结合在铁蛋白的什么部位? 为什么 Mg-ATP 在这种部位的结合会活化电子, 并使得铁蛋白中的铁硫原子簇更易与亚铁螯合剂反应? Mg-ATP 的酶促水解与电子传递的偶联关系如何? 弄清这些问题, 不仅是深入理解固氮酶反应中电子传递的关键, 而且也有助于解决许多生理过程的能量转换、传递和贮存机制方面的问题。

铁蛋白是由两个亚基组成的二聚体, Fe_4S_4^* 原子簇为铁蛋白的电子传递中心, 起着贮存和传递电子的作用。 Fe_4S_4^* 原子簇位于两个蛋白亚基之间。 一个铁蛋白可以结合两个 Mg-

ATP。 Mg-ATP 与还原态铁蛋白的结合, 使得铁蛋白的氧化还原电位负移约 110mV, 同时增大铁蛋白对氧的敏感性 (100 倍以上)^[1]; Mg-ATP 与铁蛋白的结合, 使得铁蛋白的非轴对称的 ESR 信号变成近似轴对称, 信号振幅减小, 在 $g = 1.43$ 处强度增大或产生分裂信号^[2]。 Mg-ATP 与铁蛋白的结合, 使得氧化态的非对称性铁硫生色团的 CD 谱发生很大的变化, 用 ATP 滴定氧化态铁蛋白, 其 CD 谱分别在 325, 390 和 450nm 处出现三个新的等吸收点^[3]; Mg-ATP 与还原态铁蛋白的结合, 引起 ATP 的 α -、 β -和

* 国家自然科学基金 助项目。

- 1975; 250: 2640
- 3 Tada M, Kadoma M, Inui M *et al. Methods in Enzymology*, 1988; 157: 107
- 4 Le Peuch C J, Le Peuch D A M, Demaille J G. *Biochemistry*, 1980; 19: 3368
- 5 Jones L R, Simmerman H K B, Wilson W W *et al. J Biol Chem*, 1985; 260: 7721
- 6 Simmerman H K B, Collins J H, Theibert J L *et al. J Biol Chem*, 1986; 261: 13333
- 7 Imagawa T, Watanabe T, Nakamura T. *J Biochem (Tokyo)*, 1986; 99: 41
- 8 Suzuki T, Lui P, Wang J H. *Biochem Cell Biol*, 1987; 65: 302
- 9 Le Peuch C J, Haiech J, Demaille J G. *Biochemistry*, 1979; 18: 5150
- 10 Movsesian M A, Nishikawa M, Adelstein R S. *J Biol Chem*, 1984; 259: 8029
- 11 Raeymaekers L, Hofmann F, Casteels R. *Biochem J*, 1988; 252: 269
- 12 Wegener A D, Simmerman H K B, Liepnieks J *et al. J Biol Chem*, 1986; 261: 5154
- 13 Nagal R *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 2966
- 14 Suzuki T, Wang J H. *J Biol Chem*, 1986; 261: 7018
- 15 Suzuki T, Wang J H. *J Biol Chem*, 1987; 262: 3880
- 16 Jakab G, Kranias E G. *Biochemistry*, 1988; 27: 3799
- 17 Kranias E G, Di Salvo J. *J Biol Chem*, 1988; 263: 15681
- 18 Lyer R B, Koritz S B, Kirchberger M A. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1988; 55: 1
- 19 Fowler C, Huggins J P, Hall C *et al. Biochem Biophys Acta*, 1989; 980: 348
- 20 Li C F, Wang J H, Colyer J. *Biochemistry*, 1990; 29: 4535

[本文于1990年8月20日收到, 11月7日修回]