

ical mapping of human loci homologous to the chicken nov proto-oncogene. *Oncogene*, 1992, **7**: 2529~ 2534

6 Bork P. The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett*, 1993, **327**: 125~ 130

7 Li Wenxin (李文鑫), Martinier C, Zumkeller W *et al.* Differential expression of nov H and CTGF in human glioma cell lines. *J Clin Mol Pathol*, 1996, **49** (2): 91~ 97

8 Perbal B. Caracterisation et expression du proto-oncogene nov humain dans les tumeurs de Wilms. *Bull Cancer*, 1994, **81**: 957~ 961

9 Igarashi A, Okochi H, Bradham D M *et al.* Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell*, 1993, **4**: 637~ 645

10 Werner H, Re G G, Drummond I A *et al.* Increased expression of the insulin-like growth factor I receptor gene, IGF1R, in Wilms' tumor gene product. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **89**: 5828~ 5832

11 张颖, 曾宪春, 李文鑫. Vero 细胞中肿瘤细胞生长抑制及 nov 表达调控因子的初步研究. *武汉大学学报 (自然科学版)* (生物工程专刊), 1996, 139~ 145

12 蒋达和, 李文鑫. 鸡肾癌 nov 基因亚克隆及表达. *武汉大学学报 (自然科学版)*, 1994, **40** (6): 99~ 102

Studies on nov Gene. ZENG Xianchun, JIANG Dahe, LI Wenxin (*School of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China*); B. PERBAL (*Laboratoire d'Oncologic Virale et Moleculaire, Institut Curie, 91405 Orsay Cedex, France*).

Abstract nov gene is a novel cellular oncogene which might play an important role in cell proliferation, oncogenesis and embryonic development. The discovery, structure and function, expression and regulation of the nov gene, and the relation to its relevant genes are described.

Key words nov gene, nephroblastoma, Wilms' tumor, regulator of cell growth, gene expression

FK-506 结合蛋白对钙释放通道的调控

孙俊辉 朱培阁

(中国科学院上海生理研究所, 上海 200031)

摘要 细胞内自由钙作为一种重要的细胞信使广泛地参与细胞生理功能调控. 胞内钙库 (内质网系和肌浆网系) 对调节细胞内自由钙水平起着重要的作用. 钙库膜上的钙释放通道 (ryanodine 受体和三磷酸肌醇受体) 受许多因素调控, 其中之一就是新近研究得相当多的 FK506 结合蛋白. 免疫抑制剂 FK506 能特异地结合钙库上一种分子质量为 12 ku 左右的蛋白, 这种 FK506 结合蛋白与钙释放通道形成一种紧密连接的复合体, 在正常生理情况下对钙释放通道起着十分重要的调控作用.

关键词 胞浆自由钙, 钙释放通道, FK506, FK506 结合蛋白, 细胞信号转导

细胞内自由钙作为一种重要的细胞信使广泛地参与调控细胞的生理功能. 胞内钙库 (内质网系和肌浆网系) 对调节细胞内自由钙水平起着重要的作用. 细胞的内质网系或肌浆网系是胞内钙库的主要成分, 其膜上的钙释放通道和钙泵 (Ca²⁺-ATPase) 分别起着释放钙库中的贮钙到胞浆及将胞浆自由钙泵回钙库的作用. 已知钙释放通道主要有两种类型, 根据与它们特异性结合的配体分别命名为 ryanodine 受体 (RyR) 和三磷酸肌醇受体 (IP₃R), 这

两类受体又分为多种亚型^[1]. 钙释放通道的活动受许多因素的调控^[2,3]. 本文将着重介绍新近研究得相当多的细胞内一种能与免疫抑制剂 FK506 特异性结合的蛋白——FK506 结合蛋白 (FKBP), 及其对钙释放通道的调控和可能机制.

1 FK506 与 FK506 结合蛋白

免疫抑制剂被广泛用于防止器官移植中可

能发生的免疫排斥反应. 近年来, 许多新的免疫抑制剂被发现并被广泛地应用于临床研究, FK506 就是其中具有代表性的一种药效较高的免疫抑制剂. FK506 以内酰胺内酯组成一个大型的疏水性环状结构 (图 1), 含有吡喃糖基, 同时还含有环己基和六氢吡啶羧基两个重要的侧基基团. 从化学结构来看, FK506 主要分为两个部分: 与亲免蛋白作用的结合区段和结合后发挥免疫抑制效应的药效区段. 药理学的研究表明, FK506 在与亲免蛋白结合后, 内酰胺内酯第 2 位上的羧基与六氢吡啶羧基上的酰胺基团发生了由顺式 $\rightarrow$ 反式的立体结构变化; 与此相应, 吡喃糖基则发生由疏水性的环内向环外的结构翻转^[4].

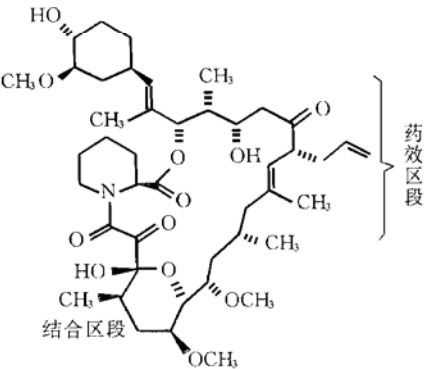


图 1 FK506 的化学结构及其主要作用区段
FK506 通过结合区段与亲免蛋白 FKBP 结合, 通过药效区段影响 FKBP 的结构功能变化.

当 FK506 被发现并初步应用于临床研究时, 研究者就提出在体内可能存在这一免疫抑制剂的受体, 即存在一种与 FK506 特异结合的亲免蛋白. 这一推断导致了体内一种新的亲免蛋白——FK506 结合蛋白 (FKBP) 的发现. 核磁共振和分子动力学的研究表明^[5], FKBP 含有一个内凹的由五个链型 β 折叠组成的空穴结构, 其上被 α 螺旋片段所覆盖, FK506 即结合于此部位. 目前已经清楚地知道, FKBP 在体内起一种肽基-脯氨酰基-顺反异构酶 (peptidyl prolyl *cis-trans*-isomerases, PPIases) 的作用, 它可以通过帮助蛋白质重

新折叠从而改变蛋白质的立体结构, 有利于蛋白质的跨膜运输^[4]. 当 FK506 与 FKBP 结合后, FK506 特有的立体化学结构就抑制了 FKBP 的 PPIases 活性, 进而发挥其免疫抑制效应.

FKBP 首先从人类 T 细胞中分离克隆; 并且还发现, FK506-FKBP 复合体在体内能有效地抑制一种钙/钙调蛋白依赖的蛋白磷酸酶 calcineurin, 这一抑制作用进一步阻止了 T 细胞激活所需的白介素 IL-2 的基因转录过程^[6]. FKBP 虽然以一种亲免蛋白的形式参与机体免疫系统调控, 但在其他组织细胞中也有广泛的分布.

2 钙释放通道的结构功能特性

RyR 和 IP₃R 是迄今已知细胞内分子质量最大的配体门控通道. 这两类钙释放通道都是以四个亚基组成的四聚体形式存在, 并且两者在结构和功能上有很大的相似性. RyR 首先发现于骨骼肌和心肌的肌浆网. 目前已知 RyR 有三种亚型: 骨骼肌型 (RyR1)、心肌型 (RyR2) 和脑型 (RyR3)^[1]. 这三类亚型 RyR 启闭受许多因素调控, 例如: 细胞膜电位、Ca²⁺、Mg²⁺、ATP、蛋白激酶、环化二磷酸腺苷核糖等. 此外, ryanodine、咖啡因、dantrolene、钆红等药物也能调控这些通道的启闭^[2,3]. IP₃R 也有三种亚型, 其中 IP₃R1 是神经细胞中最主要的亚型. IP₃R 的通道活性主要受 IP₃、Ca²⁺ 和蛋白激酶等因素的影响^[2,3].

正如上所述, 钙释放通道受很多因素的调控. 此外, 还发现有一些蛋白在体内与钙释放通道紧密相连, 可能通过蛋白间的相互作用参与对钙释放通道的调控. 例如: 骨骼肌细胞三联体处肌浆网系上的 RyR 与横小管膜上的电压感受器二氢吡啶受体以及 triadin 等三联体蛋白联系紧密, 组成了骨骼肌兴奋收缩偶联的结构基础. 兴奋信号 (横小管膜去极化) 通过这些蛋白质的相互作用得以传递给肌浆网系上的 RyR, 使其打开释放钙并最终导致肌肉收

缩。对于 IP_3R , 也有某些小分子质量的钙结合蛋白质与之发生蛋白之间的相互作用, 并可能参与对 IP_3R 的功能调控^[2]。最新的研究清楚表明, 亲兔蛋白 FKBP 与这两类钙释放通道在体内都以紧密的复合体形式存在, 提示 FKBP 可能通过某种机制参与对钙释放通道的功能调控^[7,8]。

3 FKBP 和钙释放通道形成复合体

1992 年, Jayaraman 等^[7]首先在兔骨骼肌上发现一种分子质量 12 ku 的 FKBP (FKBP12), 它与 RyR1 在体内以紧密相连的复合体形式存在; 并且, 这种复合体仅存在于肌浆网系终池处。进一步的研究发现, FKBP12 与钙释放通道在数量上有着 4:1 的对应关系, 即组成钙释放通道四聚体的每个 RyR1 单体各结合一个 FKBP12。在亚细胞结构水平, FKBP12 与 RyR1 的胞浆部结合; 并且, FKBP12 所在的位置与围成通道中心的四个单体跨膜区段相距约 10 nm^[9]。由于 RyR 存在着不同的亚型, 一个有趣的问题就是: 对于不同亚型的 RyR, 是否有不同类型的 FKBP 与之特异结合? 新近, 在心肌细胞中发现分子质量为 12.6 ku 的 FKBP (FKBP12.6), 它特异地与 RyR2 结合, 共同存在于心肌肌浆网系; 体外重组的研究表明, FKBP12.6 不能与 RyR1 结合形成复合体^[10]。这一研究结果有力地说明: FKBP 不仅与 RyR 形成紧密的复合体; 而且, 与不同亚型 RyR 结合的 FKBP 存在着类型上的差异。

由于 IP_3R 与 RyR 在结构和功能上非常相似, 那么对于 IP_3R 是否也有类似的情况呢? 新近, Cameron 研究小组^[8,11]的工作表明, 在体内 IP_3R 也与 FKBP 形成紧密相连的复合体, 与 RyR 的情况相似, FKBP 也参与对 IP_3R 的功能调控。但仍不清楚的是: 与 IP_3R 结合的 FKBP 是否与 RyR 结合的同属一个类型? 对于不同亚型的 IP_3R 是否也对应存在着不同类型的 FKBP?

4 FKBP 对钙释放通道的调控

研究发现, FK506 能非常有效地与钙释放通道竞争结合 FKBP, 并且 FK506 的这一作用是不可逆的。目前, 主要以分离的肌浆网系组成的脂质体或将纯化的通道蛋白重组到人工脂双层膜, 利用电生理学方法对钙释放通道特性进行研究。通常, 分离的肌浆网系组分中钙释放通道是与 FKBP 以复合体形式存在的, 当加入 FK506 后, 它可将 FKBP 从肌浆网系组分中解离出来。而纯化的钙释放通道是不含 FKBP 的, 但 FKBP 与钙释放通道能在体外进行重组, 重组后的复合体又能通过加入 FK506 将引入的 FKBP 有效地解离。对比 FKBP 有无条件下的通道特性, 可以推断 FKBP 对钙释放通道调控的可能机制。

综合近来的研究表明, FKBP 对钙释放通道的调控作用主要表现在以下几个方面:

a. FKBP 对钙释放通道的稳定作用。并且, FKBP 的这一作用与钙释放通道的本身状态密切相关。例如: FKBP 缺失的兔骨骼肌肌浆网系与对照相比, RyR/钙释放通道有着更大的开放几率和更长的平均开放时间^[12]。纯化的大鼠小脑神经元细胞来源的 IP_3R (缺失 FKBP) 也表现出类似的通道特性^[9]。这一结果提示, 在体内 FKBP 可能对钙释放通道的关闭状态起着蛋白构象上的稳定作用。Timerman 等^[13]发现, 缺失 FKBP 的骨骼肌肌浆网系终池对钙有一定程度的渗漏, 与对照相比对钙重摄取的速率明显降低; 如果将 FKBP 重新组合到缺失 FKBP 的肌浆网系终池内, 钙重摄取的速率则恢复到对照水平。上述结果说明缺失 FKBP 的钙释放通道对钙有一定的通透性, 这从另一侧面反映 FKBP 对关闭状态钙释放通道的稳定作用。此外, 在海胆卵母细胞共同表达 RyR1 和 FKBP12 的实验结果表明, 在缺失 FKBP12 的细胞中 RyR1 表现多个亚电导特性; 当引入 FKBP12 后, 通道原有多个亚电导状态的情况大大减少^[14]。这一结果提示, FKBP 在细胞体内可能起增强组成钙释放通道

的四个亚基的协同效应,使得通道稳定在关闭或完全开放状态,从而有效地限制了钙释放通道的部分开放^[14,15]。

b. FKBP 对钙释放通道的整流作用. 双层脂膜单通道记录的研究表明, RyR1-FKBP 复合体状态下的通道电流表现为单向的由肌浆网系腔向胞浆的传导特性,而反向电流将很快去活. 并且, FKBP 对 RyR1/钙释放通道的整流作用还与细胞膜电位有关. 这些研究结果提示, FKBP 可能通过改变钙释放通道各亚基构象实现对通道的整流调控,这种整流特性能有效地防止骨骼肌肌浆网系快速释放钙过程中的反向电流^[16]. 由于 RyR 和 IP₃R 在通道特性上存在着较大的差异,一个很容易想到的问题就是: FKBP 对两类钙释放通道是否有着不同的整流调控方式? 对这一问题的回答还有待做进一步的研究.

c. FKBP 通过蛋白质间的相互作用使得 calcineurin 特异性地定位于钙释放通道,从而有利于 calcineurin 对钙释放通道进行蛋白磷酸化修饰. Calcineurin 是广泛存在于各种细胞内的一种钙/钙调蛋白依赖的蛋白磷酸酶, FK506-FKBP 复合体在体内能有效地抑制 calcineurin 的活力^[5,17]. 进一步的研究表明,在体内 calcineurin 可以通过 FKBP 被“锚定”在钙释放通道上,形成一种紧密相连的 calcineurin-FKBP-钙释放通道的复合体^[5,11,17]. 已知钙释放通道能被多种蛋白激酶产生的蛋白质磷酸化调控^[2,18],与 FKBP/钙释放通道相连的 calcineurin 可能通过蛋白质磷酸化/去磷酸化效应实现对钙释放通道的调控. 并且,比较对各种蛋白激酶磷酸化底物的去磷酸化效应, Calcineurin 对蛋白激酶 C (PKC) 磷酸化位点的去磷酸化作用最为明显^[10,19].

目前,有关 FKBP 对钙释放通道的调控机制了解得还十分不清楚. 早期研究曾推测, FKBP 可能是通过其本身具有的 PPIase 活力实现对钙释放通道的蛋白质构象调控. 但是新近, Timerman 等^[20]发现突变缺失 PPIase 活力的 FKBP 同样具有调控钙释放通道的能力,

提示 FKBP 对钙释放通道的调控可能是通过 PPIase 以外的其他机制实现的. 因此,有关 FKBP 对钙释放通道的调控机制还有待做进一步的探讨.

参 考 文 献

- 1 Furuichi T, Kohda K, Miyawaki A *et al.* Intracellular channels. *Curr Opin Neurobiol*, 1994, **4**: 294~ 303
- 2 Ehrlich B E. Functional properties of intracellular calcium release channels. *Curr Opin Neurobiol*, 1995, **5**: 304~ 309
- 3 Ehrlich B E, Kftan E, Bezprozvannaya S *et al.* The pharmacology of intracellular Ca²⁺-release channels. *Trends Pharmacol Sci*, 1994, **15**: 145~ 149
- 4 Fruman D A, Burakoff S J, Bierer B E. Immunophilins in protein folding and immunosuppression. *FASEB J*, 1994, **8**: 391~ 400
- 5 Marks A R. Cellular functions of immunophilins. *Physiol Rev*, 1996, **76**: 631~ 649
- 6 Sigal N H, Dumont F J. Cyclosporin A, FK-506, and rapamycin: pharmacological probes of lymphocyte signal transduction. *Annu Rev Immunol*, 1992, **10**: 519~ 560
- 7 Jayaraman T, Brillantes A M, Timerman A P *et al.* FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem*, 1992, **267**: 9474~ 9477
- 8 Cameron A M, Steiner J P, Sabatini D M *et al.* Immunophilin FK506 binding protein associated with inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor modulates calcium influx. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 1784~ 1788
- 9 Wagenknecht T, Grassucci R, Berkowitz J *et al.* Cryoelectron microscopy resolves FK506-binding protein sites on the skeletal muscle ryanodine receptor. *Biophys J*, 1996, **70**: 1709~ 1715
- 10 Lam E, Martin M M, Timerman A P *et al.* A novel FK506 binding protein can mediate the immunosuppressive effects of FK506 and is associated with the cardiac ryanodine receptor. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 26511~ 26522
- 11 Cameron A M, Steiner J P, Roskams A J *et al.* Calcineurin associated with the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulates calcium influx. *Cell*, 1995, **83**: 463~ 472
- 12 Mayrleitner M, Timerman A P, Wiederrecht G *et al.* The calcium release channel of sarcoplasmic reticulum is modulated by FK-506 binding protein: effect of FKBP-12 on single channel activity of the skeletal muscle ryanodine receptor. *Cell Calcium*, 1994, **15**: 99~ 108
- 13 Timerman A P, Ogunbumni E, Freund E *et al.* The calcium release channel of sarcoplasmic reticulum is modulated by FK-506 binding protein. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 22992~ 22999
- 14 Marks A R. Immunophilin modulation of calcium channel gating. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 1996, **9**: 177~ 187
- 15 Chen S R W, Zhang L, MacLennan D H. Asymmetrical blockade of the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) by 12 ku FK506 binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*,

1994, **91**: 11953~ 11957

16 Ma J J, Bhat M B, Zhao J Y. Rectification of skeletal muscle ryanodine receptor mediated by FK506 binding protein. *Biophys J*, 1995, **69**: 2398~ 2404

17 Griffith J P, Kim J L, Kim E E *et al.* X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell*, 1995, **82**: 507~ 522

18 Hain J, Onoue H, Mayrleitner M *et al.* Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 2074~ 2081

19 Collins J H. Sequence analysis of the RyRec: possible association with a 12 k, FK506-binding immunophilin/PKC inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, **178**: 1288 ~ 1290

20 Timmerman A P, Wiederrecht G, Marcy A *et al.* Characterization of an exchange reaction between soluble FKBP-12 and the FKBP-ryanodine receptor complex. Modulation by FKBP mutants deficient in peptidyl-prolyl isomerase activity. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 2451~ 2459

Modulation of Calcium Release Channels by FK506-binding Protein. SUN Junhui. ZHU Peihong (*Shanghai Institute of Physiology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*).

Abstract As an important messenger, intracellular free calcium can modulate many cellular functions. Calcium stores, endoplasmic reticulum and sarcoplasmic reticulum, play important functions in controlling the level of intracellular calcium. The activities of calcium release channel on these calcium stores, ryanodine receptor and inositol trisphosphate receptor, are affected by several factors. FK506, an immunosuppressive drug, can specifically bind to a cytosolic receptor with molecular weight of about 12 ku, namely, FK506-binding protein (FKBP12). *In vivo*, FKBP12 maintains a tight association with calcium release channel and forms a complex. This interaction plays important roles in modulating calcium release channels.

Key words cytosolic free calcium, calcium release channel, FK506, FK506-binding protein, cellular signal transduction

微生物表面呈现技术及应用*

王雨田 胡家露 陈苏民¹⁾

(第四军医大学全军消化疾病研究所, 西安 710033)

杨胜利

(中国科学院上海生物工程研究中心, 上海 200233)

摘要 微生物表面呈现技术以其广泛的应用前景, 日益引起关注. 文章就细菌和酵母微生物表面呈现系统的构建及其应用进行了较为全面的综述.

关键词 微生物, 表面呈现, 表达载体

微生物表面呈现是用基因重组方法将外源性蛋白质功能性地表达于微生物表面. 90年代初, 由 McCafferty^[1] 构建成功的噬菌体表面呈现系统大大地简化了抗体库构建及单链抗体筛选过程, 也激发了人们构建新型表面呈现系统的热情. 目前, 微生物表面呈现系统有四类, 分别为: 细菌呈现系统^[2~4]、酵母呈现

系统^[5]、噬菌体^[6,7]及病毒^[8]呈现系统. 由于细菌、酵母系统具有更广泛的应用性, 已成为竞相研究的热点, 本文就其研究进展进行综述.

* 国家自然科学基金 (39470785) 及全军医药卫生青年基金 (96Q078) 联合资助.

¹⁾ 第四军医大学生物化学教研室, 西安 710032.

收稿日期: 1996-10-03, 修回日期: 1997-01-20