

6 磷酸葡萄糖酶活性随年龄增加而降低, 但 T_3 对大鼠肝微粒体 6 磷酸葡萄糖酶的诱导作用, 老年组显著高于青年组, 由于 T_3 的诱导, 消除了该酶活性的年龄差异. 该诱导酶的年龄差异被认为是衰老的表现. TSH 诱导甲状腺中的碘甲状腺原氨酸单脱碘酶的合成, 该酶使 T_4 转变为 T_3 , 并使 T_3 和 rT_3 转变为 T_2 . 用 TSH 处理狗, 狗甲状腺中该酶的活性显著增强. 增加 V_{max} 值(T_4 由 12.3 增加为 53.4 pmol, T_3 由 25.3 增加到 112 pmol, rT_3 由 113 增加到 272 pmol), 并大大加强 T_4 和 T_3 的转换率. 老年动物 TSH 对甲状腺的效应显著高于青年动物, 因此, 该脱碘酶在内源 TSH 作用下合成增加, 活性加强, 甲状腺激素的转换率也大大增加, 致使老年动物甲状腺的 T_4 和 T_3 含量下降.

参 考 文 献

[1] Ohrloff, C. et al.: *J. Gerontol.*, 38(3), 271,

1983.

[2] Vyas, K. N. et al.: *Indian J. Animal Sci.*, 6, 396, 1982.

[3] 野间昭夫:《日本临床》, 39, 536, 1981.

[4] Gambert, S. R. et al.: *J. Gerontol.*, 38, 23, 1983.

[5] Urdal, P. et al.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 42, 621, 1982.

[6] Vallet-Strouve, et al.: *J. Steroid Biochem.*, 17, 95, 1982.

[7] Roti: *Endocrinol.*, 111, 959, 1982.

[8] Tamatu, S. et al.: *Pediat. Res.*, 16, 377, 1982.

[9] Fujita, K. et al.: *Clin. Chem.*, 28, 1405, 1982.

[10] Jagenburg, R. et al.: *ibid.*, 28, 205, 1982.

[11] 折茂肇·他:《日本临床》, 39, 564, 1981.

[12] Hiremath, L. S. et al.: *J. Gerontol.*, 37, 680, 1982.

[13] Marx, J.: *Science*, 186, 1196, 1974.

[14] Adelman, R. C. et al.: *Federation Proc.*, 38, 1968, 1979.

[15] Boyd-leinen, P. A. et al.: *Endocrinol.*, 111, 30, 1982.

[16] WU, S-Y: *Endocrinol.*, 112, 417, 1983.

[17] Dobrosielski-Vergona, K. et al.: *Endocrinol.*, 111, 953, 1982.

[本文于1984年1月15日收到]

钙调蛋白的结构与功能(下)

徐 友 涵

(南开大学分子生物学研究所, 天津)

四、钙调蛋白的构象

CaM 分子本身无酶的活性, 在无 Ca^{2+} 情况下, 也无生物活性. 自从 1973 年 Teo 等人鉴定它是一种钙结合蛋白以来, 人们用各种物理、化学手段发现 Ca^{3+} 的结合引起蛋白强烈的构象变化, $Ca^{2+} \cdot CaM$ 复合物才能与靶蛋白结合形成一个活性全酶, 因此 CaM 构象问题是其调控机制的中心问题.

1. 研究构象的方法

(1) 圆二色性与紫外差谱的研究 Klee 测定 CaM 的远紫外 CD 谱, 在 EGTA 存在下, 椭圆度 $[Q]_{221nm} = -11500$ 度 $\cdot cm^2/分 \cdot 克分子$, 相当 35% 螺旋, 50% 无规卷曲, 20% β -折迭. 而在 0.3mM Ca^{2+} 存在下, $[Q]_{221nm}$ 增加约 20%, 相当于 α 螺旋增加 5—8%, 无规卷曲相

应减少, 换言之, CaM 分子结构因 Ca^{2+} 的结合而变得更加致密. CaM 的近紫外 CD 谱也得到类似的结果.

紫外差谱证明 Ca^{2+} 结合后, CaM 中 Tyr、Phe 残基的微环境都有变化. 用 Ca^{2+} 滴定时, CaM 在 279、286nm 的吸收值降低, 其差谱出现双负峰, 表示 Tyr 吸收在结合 Ca^{2+} 时蓝移, Klee 认为负差谱可解释为 Ca^{2+} 结合引起 Tyr 残基更加暴露. Tyr 的 pK 值在 Ca^{2+} 结合后由 10.4 下降到 10.1, 似乎也支持这一说法.

(2) 荧光光谱的研究 脊椎动物 CaM 含 Tyr 138, Tyr 99 常作为内源性荧光探针使用. CaM 不含色氨酸, 其荧光谱属于典型的 A 类蛋白, 在 305nm 处有一特征荧光峰. Ca^{2+} 结合后, 其内源荧光量子产率增加约 2.5 倍. Kilhoffer 比较鼠睾丸与章鱼 CaM(后者只含有一个 Tyr 138)

的荧光,研究无 Ca^{2+} 时 CaM 内源荧光淬灭的机制和二个 Tyr 残基各自对荧光的贡献^[11]。若以量子产率增加作为 Ca^{2+} 结合时 CaM 构变程度的指标,所得结果与其他物理手段(如紫外差谱、ESR·NMR)十分一致,即头二个 Ca^{2+} 结合到蛋白后,已产生 80% 以上的构象变化。

Laporte 使用 CaM 的荧光标记衍生物,从荧光各向异性计算斯托克半径,发现 Ca^{2+} 存在时其值为 23.5 Å,无 Ca^{2+} 下该值为 24.1 Å,似乎也表明 Ca^{2+} 结合后分子结构变得更加致密。同时 Ca^{2+} 结合后探针的荧光强度增加 20%,荧光谱蓝移,荧光寿命增加,暗示探针基团在 Ca^{2+} 结合后减少了在溶剂中的暴露。

用几种外源疏水探针如 ANS、9-蒽酰胆碱、 Ca^{2+} 拮抗药物 Felodipine^[17]、CaM 拮抗药物三氟噻吨^[13]研究表明它们依赖 Ca^{2+} 结合到 CaM 后,荧光谱强数倍,最大发射蓝移,暗示蛋白在 Ca^{2+} 结合后翻转出更多的疏水面,形成与靶酶或 CaM 拮抗药物的结合位。现在普遍认为这种构变对 CaM 执行其生物功能是必需的。

(3) 顺磁共振波谱的研究 最近笔者用自旋标记物 Tempo-碘乙酰胺和 Tempo-马来酰亚胺标记 CaM^[12],其衍生物的生物活性近似于天然 CaM,ESR 谱呈现弱固定化的特征。标记基团的旋转相关时间 τ_R 由公式

$$\tau_R = 6.5 \times 10^{-10} \times \Delta H_0 \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 1 \right)$$

表征,其中 ΔH_0 为中场线宽度, h_{-1} 、 h_0 分别表示高场、中场谱线的高度。对 Tempo-马来酰亚胺标记的 CaM,在无 Ca^{2+} 与有 Ca^{2+} 时, τ_R 分别为 0.95、11.4 毫微秒,这也说明蛋白在结合 Ca^{2+} 后跃迁为更致密的形式。以 τ_R 作为构变指标,表明头二个 Ca^{2+} 的结合引起 80% 以上的构象变化,而 Mg^{2+} 需在 10 倍以上浓度范围才引起很小的构变,这结果与 CD、荧光波谱、NMR 研究十分一致。

(4) 核磁共振波谱的研究 Seamon 等人用 360MHz₂ 质子-NMR 研究 CaM 构象,以 Phe、Tyr 138 的化学位移作为构象变化的指

标。他们认为 Ca^{2+} 诱导的构象跃迁可分两步,第一步是结合二个 Ca^{2+} ,第二步结合四个 Ca^{2+} 。结合头二个高亲和 Ca^{2+} 引起 His 107、Tml (三甲基赖氨酸) 115、Tyr 138、His 135 (分别位于 III、IV 结构域) 的质子共振峰的化学位移改变,同时 Ca^{2+} ·CaM 的质子峰与无 Ca^{2+} 的 CaM 质子峰并存,说明这种结合是一个慢过程,每秒仅几次,速度低于 NMR 化学位移的时间范围,而后两个 Ca^{2+} 与 CaM 低亲和的结合则是一个快过程,速度在每秒几百次以上。

(5) 研究 CaM 构象的其他方法 除上述各种波谱方法外,某些化学方法也证明 Ca^{2+} 引起的蛋白构变。如胰蛋白酶消化 CaM 时,在无 Ca^{2+} 下,蛋白首先在 Arg 106,接着在 Arg 90 位断裂;结合 Ca^{2+} 的 CaM 断裂位只发生在 Lys 77。另外,结合 Ca^{2+} 的 CaM 对化学修饰试剂的反应性也发生变化,如无 Ca^{2+} 时, Tyr 138 与 N-乙酰咪唑反应, Ca^{2+} 结合的 CaM 则失去此反应性。

2. CaM 与 Ca^{2+} 及其它离子的结合

(1). CaM 对 Ca^{2+} 的亲合性 研究 Ca^{2+} 合位性质及结合的动力学是了解 CaM 结构、功能的一个重要方面。遗憾的是目前在高亲和位的数目、 Ca^{2+} 结合的顺序以及结合常数等研究方面还没有一个统一的意见。Dedman 最早用平衡透析实验表明四个 Ca^{2+} 合位是等同的,在 Scatchard 图上呈现一个斜率, Kd 值为 2.4 μM 。以后大多数研究却表示 Ca^{2+} 合位之间有负的协同性,即四个 Ca^{2+} 合位可分为二个高亲和位,二个低亲和位。前者 Kd 值约 0.2—4 μM ,后者约 10—50 μM 。有的研究还指出头二个高亲和 Ca^{2+} 合位之间又存在正协同性。

最近证明, CaM 拮抗药物, CaM 靶酶强烈影响 CaM 对 Ca^{2+} 的亲合性,如用 ^{113}Cd 作为 Ca^{2+} 的探针,其 NMR 谱出现两个高亲和位的 Cd^{2+} 共振信号,低亲和位的 Cd^{2+} 由于快速化学交换,看不见明显的共振信号,添加 CaM 拮抗物三氟拉嗪后,出现四条新的共振谱线,说明药物与 CaM 结合大大增强 CaM 对 Ca^{2+} ,特别是低亲和位 Ca^{2+} 的亲合性, CaM 靶酶与

CaM 的结合可使 CaM 对低亲和位 Ca^{2+} 的亲合力增加 1500 倍^[13]。

(2) CaM 结合 Ca^{2+} 的顺序 Kilhoffer 使用镧系元素 Tb^{3+} 作为 CaM 钙合位的光学探针,研究 CaM 结合钙的顺序。CaM 结合头二个 Tb^{3+} 时, Tyr 荧光因淬灭,荧光量子产率有所增加。但 Tb^{3+} 本身发光很小,而且结合第 3、4 个 Tb^{3+} 后, Tyr 荧光强烈下降,同时 Tb^{3+} 发光可增强 400 倍,说明此时因偶极-四极矩相互作用,发生能量从 Tyr 到 Tb^{3+} 的转移,导致 Tb^{3+} 内构型 f-f 跃迁,产生强烈的发射(图 3)。换句话说,第 III、IV 个 Tb^{3+} 结合位是在紧靠含 Tyr 结构域上,由此说明 CaM 结合离子时第 I、II 结构域是高亲和位,III、IV 结构域为低亲和位。

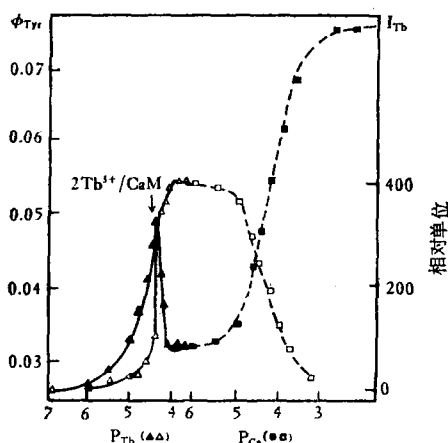


图 3 铽与 CaM 的结合导致 CaM 内源荧光(—▲—)和 Tb^{3+} 发光(—△—)的变化。

($\text{PTb} = -\log[\text{Tb}^{3+}]$)

虚线代表 Ca^{2+} 顶替 Tb^{3+} 后, CaM 内源荧光(……■……)和 Tb^{3+} 发光(……□……)的变化。

CaM 浓度为 $22\mu\text{M}$, 在 100mM Tris (pH 6.9)缓冲液中。

用 NMR 研究 Ca^{2+} 结合的顺序却得到相反的结论: 即结合头二个 Ca^{2+} 影响 Tyr 99, Tyr 138 的共振,从而认为高亲和位在 III、IV 结构域。也许这并不能排除头二个 Ca^{2+} 结合在 II、I 结构域后会牵动整个蛋白构变而影响位于 III、IV 域的二个 Tyr 的共振。而用铽做光学探针时,因 Tb^{3+} 发光效应来自离子与苯环间的偶极-四极矩相互作用,因而对空间

的依赖性更强,似乎用它做光学探针研究离子结合的顺序,结果更为可靠。最近还有人认为温度诱导 CaM 具有不同的构象,从而有不同的 Ca^{2+} 填充顺序^[14]。

(3) CaM 与其他阳离子的结合 最近,笔者用 CaM 内源荧光作为构变指标,比较四种不同的二价离子 Ca^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 引起蛋白构变的能力^[15]。以 Ca^{2+} 诱导的 CaM 构变为 100% 计, Cd^{2+} 、 Mn^{2+} 在与 Ca^{2+} 同样的浓度范围内诱导的构变为 Ca^{2+} 的 80%、30%。 Mg^{2+} 则在比 Ca^{2+} 高 20 倍浓度时才引起很小的构变,说明 Ca^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Mn^{2+} 可能竞争结合同一结合位。CaM 对二价离子结合的选择性与离子半径有关: Ca^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 离子半径分别为 0.99、0.97、0.80、0.65 Å,引起构变的能力 $\text{Ca}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ 。这些二价离子与 CaM 复合物活化 PDE 的能力也以同样顺序递减。

在许多生理活性方面, Zn^{2+} 与 Ca^{2+} 呈现相反的效应,这两种离子的拮抗可能正是基于对 CaM 功能呈现拮抗作用,即 Zn^{2+} 抑制 CaM 功能,这可用于治疗过量 Ca^{2+} 引起的镰刀红细胞贫血症。

除二价离子外, Tb^{3+} 与 CaM 的结合可与 Ca^{2+} 一样有效地活化 PDE^[16]。相反 Al^{3+} 诱导 CaM 构变,则完全阻断 Ca^{2+} ·CaM 的生物活性。

3. 钙调蛋白的识别机制

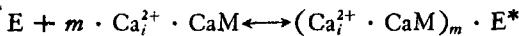
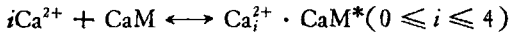
至今已发现至少 15 种不同的酶都受 CaM 的调控。一个有趣的问题是 CaM 如何识别这些不同的靶酶? 即它如何知道在特定的场合该激活哪一种酶? 以修饰某种功能? 人们很难设想 CaM 会在同一时刻激活所有的靶酶。对此可以有以下的解释: (1) 不是所有的细胞都含有全部 CaM 调节的酶, (2) Klee 等设想 CaM 结合不同数量的 Ca^{2+} 有不同的构象,含 4 个 Ca^{2+} 合位的 CaM 理论上应有 16 种不同的构象,不同的靶酶可识别 CaM 不同的构象,于是 CaM 就将不同 Ca^{2+} 浓度的信息翻释成不同的反应性。例如,动力学研究证明,激活 PDE 与

MLCK, 要求结合四个 Ca^{2+} 的 CaM, 而激活 Ca^{2+} -ATPase 则要求三个 Ca^{2+} 的 CaM, 而环化酶似乎被含二个 Ca^{2+} 的 CaM 激活。(3) 靶酶可能参与识别机制: 不同靶酶对 Ca^{2+} ·CaM 复合物有不同的亲和力; 另一方面酶的底物也会影响酶与 CaM 的亲和力, 如底物 cAMP 存在下, PDE 对 CaM 亲和力高于缺少底物时酶与 CaM 的亲和力。(4) 最近证明 CaM 的几个疏水结合位间有变构相互作用, 推测某些内源性结合 CaM 的蛋白结合到 CaM 疏水结合位, 通过变构作用影响 CaM 与靶蛋白的结合^[17]。

五、钙调蛋白与靶酶的相互作用

1. CaM 的作用方式

如上所述, CaM 只有在 Ca^{2+} 合后, 即 Ca^{2+} ·CaM 复合物才具有生物活性。它可以以两种方式调节代谢: (1) 直接与靶酶作用, Ca^{2+} ·CaM 复合物结合在靶酶如 PDE、环化酶、 Ca^{2+} -ATPase 的变构位上, 诱导靶酶形成活性的构象, 通常可增加 $V_{\max}$ 5~10 倍, 活化作用可分成两步:



其中 E^* 、 CaM^* 表示相应的活性构象, m 代表每个靶酶结合 CaM 的数目, (2) 通过活化依赖 Ca^{2+} ·CaM 的蛋白激酶, 磷酸化许多靶酶, 影响其活性。如磷酸化酶、糖元合成酶、酪氨酸-3-单加氧酶、色氨酸-5-单加氧酶, 以及突触膜, 囊泡上专一膜蛋白, 它们的磷酸化都受依赖 Ca^{2+} ·CaM 的蛋白激酶的催化。

2. CaM 与靶酶的结合

CaM 分子有一定的区域与靶蛋白结合, 如含三个 Met 的 71—77 肽段 (位于第 2、3 钙合环之间)。这可解释为何蛋氨酸的修饰往往导致 CaM 活性的丧失。CaM 在 Ca^{2+} 合后这个区域显然翻转到表面, 参与与靶酶的相互作用。除蛋氨酸外, 几个羧基, 4 个精氨酸, 7 个 Lys 也参与与靶酶的结合。相反, Tyr 99, Tyr 138, his 107 不参与同靶酶的结合。三甲基赖氨酸似乎增加 CaM 与靶酶的亲和力。当然也很可能 CaM 有一个以上的区域参与同靶酶的结合, 如

最近 Van Eldik 通过鉴定 CaM 抗原位是位于 C 末端 18 个氨基酸残基 (第 IV 结构域) 而 CaM 抗体抑制 CaM 与靶酶或 CaM 拮抗物 (如吩噻嗪) 的结合, 从而判断 IV 结构域也可能参与与靶酶的相互作用。

为研究 CaM 与靶酶结合的定量关系, La-porte 用双功能交联试剂——辛二亚胺酸二甲脂交联 ^{125}I -CaM 与 PDE, 证明含二个相同亚基的 PDE 结合二分子 CaM。最近 Andreasen 等用 4-重氮苯亚胺酸甲脂与 ^{125}I -CaM 反应制备重氮 CaM, 以它作为光亲和标记试剂研究 CaM 与几种蛋白: PDE、MLCK、TN-I 以及红细胞膜 Ca^{2+} -ATPase 之间的相互作用。重氮 CaM 光照 3 分钟后, 在 Ca^{2+} 存在条件下, 与结合 CaM 的蛋白交联, 产物经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳证明结合 CaM 蛋白的亚基与 CaM 形成 1:1 复合物。这也支持下列设想: 即结合 CaM 的蛋白都有一个彼此类似的结合 CaM 的结构域。Anderson 制备丹磺酰-CaM (Dansyl-CaM), 利用标记荧光的变化研究 CaM 与多肽 (如 ACTH, β -内啡肽, 胰高血糖素, P 物质) 等相互作用。测得的解离常数为 1.5—3.4 μM , 显示很高的亲和性。相反, 胰岛素, 八肽 P 物质, Leu-Met-脑啡肽, 舒缓激肽等不与 CaM 结合。

3. 影响 CaM 与靶酶亲和性的因素

如前所述, CaM 与靶酶结成的复合物 $\text{Ca}_i^{2+} \cdot \text{CaM} \cdot E^*$ 才是活性全酶, 其浓度往往决定生理反应的强度, 因此 CaM 与靶酶相互作用是 CaM 执行生物功能的关键^[13]。两者之间的亲和性可通过下列机制调节:

(1) 调幅机制 (amplitude modulation) 即细胞受刺激后, 胞内信使 Ca^{2+} 浓度的提高, 靶酶对 Ca^{2+} ·CaM 的亲和性比对无 Ca^{2+} 的 CaM 高 1000 倍以上。

(2) 调敏机制 (Sensitivity modulation) 胞内信使 Ca^{2+} 浓度不变的情况下, 各种因素可影响靶酶与 CaM 的亲和性: a) 依赖 cAMP 蛋白激酶磷酸化靶酶, 增加 (所谓正调敏) 或降低 (所谓负调敏) 靶酶对 CaM 的亲和性, 磷酸

化酶激酶、肌球蛋白轻链激酶分别是正、负调敏的例子；b) 底物或某些变构修饰剂结合到靶酶上，改变靶酶构象，影响它与 CaM 的亲合性（如 cAMP 与磷酸二酯酶结合后提高酶与 CaM 亲合性）；c) 膜依赖 cAMP 的磷酸化，诱导膜合 CaM 的释放，增加胞浆内 CaM 浓度，依照质量作用定律，也将提高活性全酶的浓度。

六、CaM 与拮抗药物的相互作用

CaM 对靶酶的活化作用被不同类型的 CaM 拮抗剂灭活，包括抗精神病药物， α -肾上腺阻断剂，某些神经多肽，平滑肌松弛剂，某些抗肿瘤药物，局部麻醉剂， Ca^{2+} 拮抗药物等。实验证明，CaM 同拮抗剂结合与靶酶灭活，两者之间存在线性关系，相关系数达 0.99。这些拮抗剂在结构上都有两个基本特征：一是含有疏水结构，二是带正电荷，即属于阳离子双亲分子。CaM 带有的负电荷以及在结合 Ca^{2+} 后暴露的疏水区可与拮抗剂通过静电与疏水作用，以互补的形式相结合，结合位点可能正是靶酶与 CaM 相互作用的位点。

七、依赖钙调蛋白的靶酶的活化

1. 靶酶活化的方式

人们已发现许多依赖 CaM 的靶酶，除被 $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 活化外，还被其它一些方式活化，这包括：(1) 有限水解活化靶酶：许多依赖 CaM 的靶酶如磷酸二酯酶， Ca^{2+} -ATPase，MLCK，磷酸化酶激酶等都在胰蛋白酶对它有限水解后被活化，提高的活力可达到 CaM 对之活化的水平，但丧失了结合 CaM 的能力。暗示这些靶酶除催化区域外，还含有一个可结合 CaM 的调节结构域，它使靶酶在正常情况下处于抑制状态，有人称它为“抑制肽”。CaM 与它结合或抑制肽被水解酶切除掉均可使靶酶解除抑制而被活化。(2) 酸性磷脂（磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸等）、不饱和脂肪酸（油酸、花生四烯酸等）活化靶酶，这种活化作用不依赖 Ca^{2+} 。有人认为它们引起的靶酶构象变化与 CaM 类似。但由于酸性磷脂、不饱和脂肪酸与 CaM 相比小

得多，人们自然会提出一个问题：这种活化剂以单体形式还是以聚合体（胶束，脂囊泡等）形式活化靶酶？Gietzen、徐等选用荧光性脂肪酸^[18]：芘羧酸（PyDA），具有良好活化磷酸二酯酶的能力，它在形成聚合体后呈现强烈的激发态双体发射，峰值完全不同于单体荧光发射。利用激发态双体发射荧光强度 I' 与单体发射荧光强度 I 的比值可方便地表征它在溶液中的物理聚合状态。据此测定 PyDA 的 CMC 浓度为 $1\mu\text{M}$ ，但活化磷酸二酯酶要求在 $10\mu\text{M}$ 以上，从而证实是聚合体而非单体活化靶酶。

2. 靶酶活化的机制

Gietzen 等研究几种不同的 CaM 拮抗剂（三氟拉嗪，五氟利多， R_{24571} ）对以不同方式活化的靶酶的抑制作用。以 Ca^{2+} -ATPase 为例，有限水解，不饱和脂肪酸，CaM 对酶的活化都被这几种拮抗剂抑制，这表明这些拮抗剂不仅与 CaM 结合，还与 Ca^{2+} -ATPase 直接结合，如有限水解活化的 Ca^{2+} -ATPase 可直接结合 CaM 专一拮抗剂，暗示该酶中含有一个类似于 CaM 结构特点的区域（阴离子双亲结构），有人甚至设想 Ca^{2+} -ATPase 本身含一个 CaM 亚基，如同磷酸化酶激酶的情况。与 Ca^{2+} -ATPase 相反，磷酸二酯酶经有限水解活化后不被 CaM 拮抗剂抑制，说明 PDE 不含有似 CaM 的结构。在上述实验基础上，提出一个靶酶活化的可能机制^[19]：(1) 所有的活化剂都可看成一个阴离子型双亲化合物，所有 CaM 拮抗剂都可看成阳离子双亲物，拮抗剂与活化剂间通过疏水力与静电力相互作用，这只有在大于 CaM 等电点，小于拮抗剂 pK 值的 pH 范围内才能形成 CaM-CaM 拮抗剂复合物。(2) 靶酶的抑制肽也含有正电荷的疏水结构，以某种方式阻抑靶酶活性中心的功能。抑制肽可被胰蛋白酶水解切下或与 CaM 结合导致活性中心的暴露，使靶酶变成活化型。CaM 拮抗剂与活化剂的互补结合又可使酶“跳回”原来的低活性构象（图 4）。在 CaM 与靶酶相互作用的问题上尚有两个主要问题待阐明：(a) 各种靶酶是否有某种共同的结构域与 CaM 相互作用？(b) CaM 本

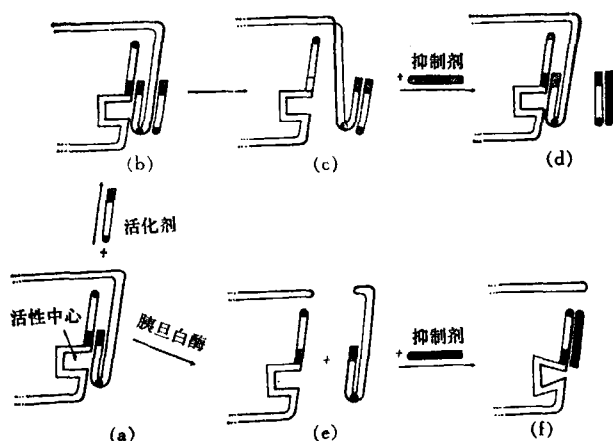


图4 依赖 CaM 靶酶的活化和抑制机制

(a) 靶酶的活性中心受到内源抑制肽(假设为带正电荷的双亲结构)阻碍。
(b) (c) 活化剂 (CaM、油酸、磷脂酰丝氨酸) 与抑制肽相互作用, 解除阻碍, 从而活化了靶酶。(d) CaM 拮抗剂与靶酶活化剂结合, 使靶酶回到低活性构象。(e) 某些靶酶(如 Ca^{2+} -ATPase) 经胰蛋白酶水解后, 切掉抑制肽, 增加活力。(f) CaM 拮抗剂也可直接结合到经有限水解活化的 Ca^{2+} -ATPase 上, 使之重新被抑制。

身是否以一个共同的空间结构与不同的靶酶相互作用? 这无疑是 CaM 调控体系结构功能相关性中的一个有趣的问题。

八、结 束 语

钙调蛋白在许多细胞代谢调控中处于中心的地位。它调节第二信使 Ca^{2+} , cAMP 代谢, 影响细胞活动的许多生理现象, 包括细胞分裂、运动、分泌、细胞与环境的信息交流等。对 CaM 研究做出很大贡献的 Klee 曾说过: “也许不久人们将不是问哪些细胞过程处于 CaM 调控之下, 而是有趣地反问, 哪些细胞过程不处于 CaM 的调控之下? 因事实已清楚地说明大量细胞代谢与功能都受这个小小的‘精心设计’的蛋白的直接或间接的控制”。鉴于它的重要性, 有人将它的发现誉为 70 年代初发现 DNA 重组以来分子生物学中最重要的发现。随着人们对它的认识日益深入, 也越来越吸引生物学家、化学家、物理学家的兴趣, 使用的研究手段也日益广泛, 短短几年来除生物化学、免疫学方法外, 各种物理手段包括顺磁、核磁、荧光、圆二色性、X 射线衍射等对 CaM 研究都取得丰硕成果。按国际信息研究所的统计, 当前有关 CaM

结构功能的研究论文正以指数速率增长, 是目前基础科学发展最快的一个领域之一。

本文承蒙黄芬教授审阅, 戴际平同志协助绘图, 谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] Marme, D.: *Biologie in unserer Zeit*, **11**, Jahrg. 71, 1981.
- [2] Cheung, W. Y.: *Scientific American*, June, 48, 1982.
- [3] Wang, J. H.: *Current Topics in cellular regulation*, vol. **115**, 47, 1979.
- [4] Tald, M. et al.: *Ann. Rev. Physiol.*, **44**, 401, 1982.
- [5] Barron, J. T. et al.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 4954, 1979.
- [6] 垣内史朗: 蛋白质, 核酸, 酵素, **27**, 2404, 1982。
- [7] Delorenzo, R. J. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **745**, 95, 1980.
- [8] Barr, R. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104**, 1182, 1982.
- [9] Laporte, D. C. et al.: *Biochemistry*, **20**, 3965, 1981.
- [10] Cook, W. J. et al.: *J. Biol. Chem.*, **255**, 8152, 1982.
- [11] Kilboffer, M. C. et al.: *Biochemistry*, **20**, 4407, 1981.
- [12] Xu, Y. H. et al.: *Intern. J. Biol. Macromol.*, vol. **5**, 154, 1983.
- [13] Rasmussen, H. et al.: *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, vol. **95**, 111, 1983.

- [14] Gangola, P. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **111**, 301, 1983.
 [15] Xu, Y. H. Ph. D. Thesis, University of Ulm, West Germany. 1983.
 [16] Wallace, R. W. et al.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 1845, 1982.

- [17] Johnsen, J. D. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **112**, 787, 1983.
 [18] Gietzen, K. et al.: *Biochem. J.*, **207**, 637, 1982.
 [19] Gietzen, K. et al.: *Biochem. J.*, **207**, 541, 1982.

[本文于1983年10月27日收到]

人红细胞膜骨骼蛋白质及其与其它膜蛋白的缔合

范 培 昌

(华东师范大学生物系, 上海)

现已肯定, 人红细胞膜细胞质表面处装饰着一层浓密的、主要由收缩蛋白和肌动蛋白组成的膜骨骼 (Membrane skeleton)^[1]. 它又通过连接蛋白等和膜嵌入蛋白质相连接^[2], 使嵌入蛋白质约以 35nm 的间距均匀地散布于膜中.

重要的是, 膜骨骼决不是人红血球膜所特有. 越来越多的报道已证明其它细胞中膜骨骼的存在. 例如, 脑髓膜的一种蛋白质——Fodrin, 已证明其与收缩蛋白类同, 并建议把 Fodrin 改名为脑收缩蛋白^[4]. 心脏肌细胞膜的两种分子量为 230,000 和 240,000 的肽链现认为是收缩蛋白 α 和 β 亚单位的同系物^[5]. 像连接蛋白的蛋白质也用免疫学方法在除红细胞之外的细胞中检出^[6]. 更直接的证据系来自用三通抽提的肝细胞膜, 电镜下清楚地看到了一种纤维状织物铺盖着整个肝细胞的细胞质表面, 人们认为它即是肝细胞膜骨骼^[7].

根据现有报道, 可把人红细胞膜骨骼的主要功能, 归纳为如下七项: (1) 稳定红细胞双面凹的形状^[1], (2) 使其富有弹性, 能顺利地通过毛细血管^[2], (3) 限制嵌入膜蛋白的横向扩散^[2], (4) 防止细胞间融合^[3], (5) 稳定脂双层结构, 防止非双层结构之形成^[3], (6) 保证类脂和嵌入蛋白质在细胞表面的均匀分布, 防止细胞内含物泄漏^[3], (7) 酶解去骨骼后就能触发 IgG 结合于膜, 促使巨噬细胞识别和吞噬, 从而把衰老红细胞从血液循环中除去^[3].

一、人红细胞膜的蛋白质组分

图 1 综合了各种十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 系统, 所得人红细胞膜蛋白质区带. 图中谱带的命名系在 Steck 命名法^[8]的基础上由其它学者扩充而来. 已公认, 在各蛋白质尚未正式命名前暂用谱带号称呼. 至于糖蛋白染色谱中的 PAS-1 等 (图 1b), 因已知均是血型糖蛋白 (Glycophorin), 现已命名为血型糖蛋白 A, B 和 C^[9].

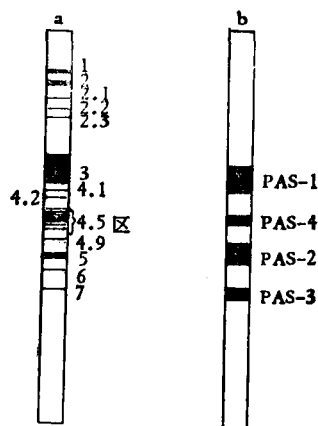


图 1 人红细胞膜蛋白的 SDS-PAGE 模式谱

a. 考马斯亮蓝染色谱.

b. 过碘酸—西夫试剂染色谱.

人红细胞膜蛋白的某些性质和功能综合于表 1. 显然, 表 1 并不完整, 许多膜蛋白组分因不甚了解而未列入. 例如: (1) 近来有人声称,