

- 14 Boss M A, Kenten J H, Wood C R *et al. Nucl Acids Res*, 1984; 12: 3791
- 15 Pluckthum A. *Nature*, 1990; 347: 497
- 16 Wood C R, Boss M A, Kenten J H *et al. Nature*, 1985; 314: 446
- 17 Hiatt A. *Nature*, 1990; 344: 469
- 18 Beidler C B, Ludwig T R, Cardenas H J *et al. J Immunol*, 1988; 141: 4053
- 19 Brown B A, Davis G L, Saltzgeber-Muller J *et al. Cancer Res*, 1987; 47: 3577
- 20 Sahagan B G, Dorai H, Saltzgeber-Muller J *et al. J Immunol*, 1986; 137: 1066
- 21 Dorai H, Moore G P. *J Immunol*, 1987; 139: 4232
- 22 Hendricks M B, Banker M J, McLaughlin H. *Gene*, 1988; 64: 43
- 23 Kabat E A, Wu T T. *Ann NY Acad Sci*, 1971; 190: 382
- 24 Riechman L, Clark M, Waldman H *et al. Nature*, 1988; 332: 323
- 25 Glockshuber R, Malia M, Pfitzinger I *et al. Biochemistry*, 1990; 29: 1362
- 26 Hasemann C A *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 3942

## 钙调素依赖性蛋白激酶 II

张光毅 赵升皓

(徐州医学院细胞调控研究室, 徐州 221002)

### 提 要

钙调素依赖性蛋白激酶 II 是钙调素的重要靶酶之一。文章综述了此酶的研究进展, 重点介绍其结构与功能的关系以及在神经组织中的生理功能。

**关键词** 钙调素依赖性蛋白激酶 II, 亚基结构, 酶活性的调控, 生理功能

激素等胞外信号分子与膜受体的相互作用常导致胞内第二信使分子的升高。在胞内信使的信息传递过程中, 蛋白激酶起着至关重要的作用。70年代初钙调素 (calmodulin, CaM) 发现不久, 人们立刻认识到  $Ca^{2+}$  信使主要是通过激活钙调素来调节靶酶的。在这些靶酶中, 钙调素依赖性蛋白激酶 II ( $Ca^{2+}$ /CaM-dependent-protein kinase II, CaM-PKII) 在哺乳动物组织中的生理功能颇受关注。七十年代末该酶分别由几个实验室独立发现, 因其能催化突触蛋白 I (synapsin I) 位点 II 的磷酸化, 故称作 CaM-PKII; 许多酶或蛋白质可作为它的底物, 因此又称为多功能钙调素依赖性蛋白激酶。

### 1 分 布

在神经组织中 CaM-PKII 含量极为丰富, 约占其总蛋白的 0.4%<sup>[1]</sup>, 在哺乳动物脑组织的某些区域, 例如大鼠海马高达 2%<sup>[2]</sup>。近几年对

大鼠脑 CaM-PKII 进行最为详尽的研究。在哺乳动物的其它组织中, 也存在 CaM-PKII 同工酶。目前, 已从哺乳动物脑、肝、骨骼肌、心肌、胎盘、肺、视网膜、乳腺、甲状旁腺和小肠刷状缘, 以及电鳗、乌贼和果蝇的神经组织中, 将该酶提纯。肽谱分析表明, 大鼠脑 CaM-PKII 与兔肝和兔骨骼肌既有同源性, 也有某些结构差异。大鼠的骨骼肌、小肠、肝、睾丸和垂体中的 mRNA, 与脑 cDNA 具有某种同源性, 但其基因表达水平却低于脑组织<sup>[3]</sup>。

CaM-PKII 的亚细胞分布也因组织而异。在大鼠脑和睾丸中, 主要存在于颗粒部分, 而在肝、心和肾等组织中, 则主要存在于胞浆可溶部分。脑中 CaM-PKII, 由两类亚基, 即  $\alpha$ (50kD) 和  $\beta$ (60kD) 或  $\beta'$ (58kD) 组成。随脑组织的发育, 酶的分布和亚基组成发生变化<sup>[3]</sup>: 大鼠

出生后 5 天, 前脑 80% 酶活性存在于胞浆内,  $\alpha$ (50kD) 和  $\beta$ (60kD) 亚基比为 1:4; 出生后 5 到 20 天之间, 80% 酶活性存在于颗粒部分, 其亚基比为 7:1。出生后 1 到 21 天之间, 前脑  $\alpha$  亚基 mRNA 水平增加 10 倍左右。在成年大鼠脑中, 终脑区(海马、皮质等)该酶活性最高, 而小脑、间脑、中脑、桥脑和延髓则较低。不同脑区亚基比例不同, 大鼠前脑  $\alpha$  和  $\beta$  亚基比例为 4:1, 小脑则为 1:4; 这些亚基比例变化与其相应亚基 mRNA 比例变化呈平行关系。在脑组织中, 该酶仅存在于神经元内, 树突和突触后致密体含量尤为丰富, 核内则极少。值得注意的是, 在突触后致密体中 CaM-PKII 仅由 50kD 的  $\alpha$  亚基组成, 占总蛋白的 30—50%。

## 2 纯 化

CaM-PKII 的纯化操作包括 DEAE-纤维素离子交换层析、磷酸纤维素离子交换层析、凝胶过滤和 CaM-亲和层析等。关键步骤有二:  
 a. 在一定 pH 和盐浓度下, 磷酸纤维素离子交换层析能除去样品中的 CaM、PDE 和钙调磷酸酶 (calcineurin, CaN);  
 b. 在  $Ca^{2+}$  存在的条件下, 该酶结合到 CaM-亲和层析柱上, 采用含 EGTA 的缓冲体系将酶分子解吸, 以除去非 CaM 结合蛋白。应用此法我们首先将牛脑 CaM-PKII 提纯为电泳均一样品<sup>[4]</sup>。

## 3 生化特性与亚基结构

CaM-PKII 是一族同工酶, 至少包括四类亚基: 两类见于神经组织(10—12 个亚基:  $\alpha$  和  $\beta/\beta'$ ), 骨骼肌(12 个亚基: 58/59kD) 和肝脏(6 个亚基: 51/53kD) 各一类。不同来源的 CaM-PKII 具有类似的生物化学特性(见表 1)<sup>[5]</sup>。

大鼠前脑 CaM-PKII 的分子量约为 550—650kD, 由  $\alpha$ (50kD) 和  $\beta/\beta'$ (60/58kD) 亚基组成。肽谱分析显示,  $\alpha$  和  $\beta$  亚基是不同的多肽, 而  $\beta$  与  $\beta'$  相类似,  $\beta'$  可能来自于  $\beta$  亚基。  $\alpha:\beta/\beta'$  为 4:1。抗 50kD 亚基单克隆抗体能识别所有三种亚基, 提示三者免疫学上具有相关性。

三种亚基均能以依赖  $Ca^{2+}$  和 CaM 的方式进行自身磷酸化。在  $Ca^{2+}$  存在时, 它们都与 CaM

表 1 大鼠脑和兔肝脏 CaM-PKII 的生化特性

	大鼠前脑	兔肝脏
物理特性		
斯托克氏半径(A)	81.3—94.7A	70A
沉降系数( $S_{20,w}$ )	13.7—16.4S	10.6S
摩擦率 ( $f/f_0$ )	1.59—1.67	1.57
分子量( $M_r$ )	460 kD—654kD	275kD—300kD
亚基大小(比率)	54kD:60kD(3:1 或 4:1)	51kD:53kD(1:1)
全酶组成	554kD—668kD(8:2 (9:3)或(10:2))	312kD(3:3)
动力学数据		
$K_{0.5}(Ca^{2+})$	0.7—0.9 $\mu$ mol/L	—
$K_{0.5}(CaM)$	29—123nmol/L	80nmol/L
$K_m(ATP)$	16—22nmol/L	27 $\mu$ mol/L
自身磷酸化与自主性	有	有
钙调素的结合	两个亚基都能结合	两个亚基都能结合
底物的识别	精-X-X-苏/丝	精-X-X-苏/丝
抑制剂	酚噻嗪, 鞘氨醇	酚噻嗪

结合, 用光亲和 ATP 标记证明这三个亚基都具有酶活性<sup>[4]</sup>。采用 cDNA 克隆法, 测定了大鼠脑三个亚基的氨基酸顺序, 结果证实它们都拥有 ATP 结合域、催化域和 CaM 结合域, 其氨基酸顺序亦完全相同。  $\alpha$  亚基由 478 个氨基酸组成,  $\beta$  和  $\beta'$  亚基分别由 542 和 527 个氨基酸组成, 它们具有很大的同源性。在亚基间, N 端区三分之二( $\beta$  亚基氨基酸残基: 1—315) 含有相同的氨基酸顺序, C 端区 ( $\beta$  亚基氨基酸残基: 393—542) 具有 76% 相同的氨基酸顺序, 中心区 ( $\beta$  亚基氨基酸残基: 316—392) 氨基酸顺序的相似性较差。ATP 结合域和催化域位于 N 端区, 而 CaM 结合域则位于 290—314 ( $\alpha$  亚基) 氨基酸残基间。目前对 C 端区的功能尚不清楚, 推测可能与全酶的组装及亚基在脑内的定位有关(见图 1)<sup>[5]</sup>。

## 4 底物的特异性

CaM-PKII 与  $Ca^{2+}$ /CaM 依赖性蛋白激酶家族的其它成员(如 Ph-PK, MLCK, CaM-PKI 和 CaM-PKIII) 不同, 前者能催化多种蛋

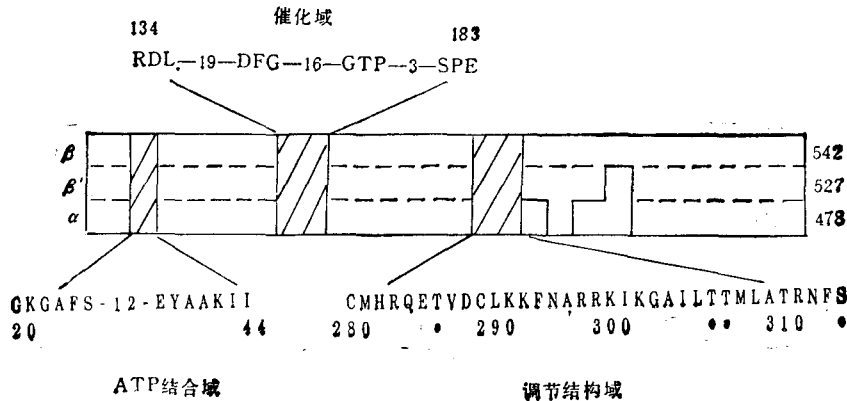


图1 大鼠脑 CaM-PK II 的功能结构示意图

542, 527 和 478 分别是组成  $\beta$ ,  $\beta'$  和  $\alpha$  亚基氨基酸残基数。  $\alpha$  和  $\beta'$  亚基间的空隙表示相对  $\beta$  亚基缺少的氨基酸位置; 斜线区为亚基间某些保守区。 左侧和中间斜线区表示与已知蛋白激酶顺序的同源性, 分别代表假定的 ATP 结合域和催化域; 右侧斜线区代表其调节结构域, 包括 CaM 结合域(氨基酸残基 296—309)、抑制结构域(氨基酸残基 281—309 之内)和自身磷酸化位点(\*), 氨基酸顺序标号根据  $\alpha$  亚基氨基酸顺序

白质或酶的磷酸化, 底物特异性差, 可被 CaM-PKII 作用的底物有: 突触蛋白 I, 平滑肌肌球蛋白轻链(MLC), 糖元合成酶, 微管连接蛋白-2(MAP-2), tau-蛋白, 酪氨酸羟化酶, 色氨酸羟化酶, 核糖体蛋白 S6, 鞘磷脂碱性蛋白<sup>[3]</sup>和 63kD PDE 同工酶<sup>[4]</sup>等。 虽然平滑肌、骨骼肌和心肌 20kD-MLC 都是 MLCK 的底物, 但仅平滑肌 MLC 是 CaM-PKII 的底物<sup>[6]</sup>。 经研究发现, 平滑肌 MLC 磷酸化位点附近氨基酸顺序有如下特点: 被磷酸化的丝氨酸残基在其 N 端第三个氨基酸是精氨酸。 人工合成的类似平滑肌 MLC 氨基酸顺序的多肽(K-K-A-P-Q-R-A-A-S-N-V-F-A-M) 可被 CaM-PKII 磷酸化, 但当其精氨酸为丙氨酸取代后, 它就不再被磷酸化<sup>[7]</sup>。 这一特异性磷酸化位点也存在于其它底物, 如糖元合成酶 (-R-T-L-S\*-), 酪氨酸羟化酶(-R-A-V-S\*-)和磷兰板蛋白(phospholamban)(-R-A-S-T\*-)<sup>[3]</sup>。 Pearson 等人<sup>[8]</sup>根据糖元合成酶磷酸化位点周围氨基酸顺序的特点, 利用人工合成的多肽研究了兔骨骼肌 CaM-PKII 的特异性, 其结果也支持这一观点。 可见, CaM-PKII 要求底物氨基酸的顺序是: R-X-X-S\*/T\*。

## 5 酶活性的调控

根据 CaM-PKII 一级结构的分析, 该酶三种亚基都含有各种功能性结构域, 其中包括 ATP 结合域、催化域和调节结构域 (CaM 结合域、抑制结构域和自身磷酸化位点)。 在缺  $Ca^{2+}$  和 CaM 的条件下, 抑制结构域抑制酶的活性, 在  $Ca^{2+}$  和 CaM 存在的条件下,  $Ca^{2+}$ -CaM 复合物结合到 CaM 结合域上, 干扰抑制结构域的作用, 从而酶被激活, 自身磷酸化位点(苏氨酸和丝氨酸)的磷酸化, 导致酶的激活并失去对  $Ca^{2+}$  和 CaM 的依赖性。 现将调节结构域三部分的结构与功能概述如下。

(a) CaM 结合域 通过比较 CaM-PKII 氨基酸顺序与其它 CaM 结合蛋白的同源性关系,  $\alpha$  亚基的 CaM 结合域应位于 295—315 氨基酸残基之间。 人工合成相应于 296—309 的多肽(简称 CaM K, 296—309)具有强烈的 CaM 结合力。  $\beta$  亚基结合域则位于 297—310 氨基酸残基之间<sup>[9]</sup>。 CaM 结合域氨基酸组成特点是: 在 290—309 氨基酸残基之间含有 80% 的  $\alpha$  螺旋, 其中有若干个碱性氨基酸残基组(291—292, 296—300), 另有一个疏水区(301—

307)<sup>[9]</sup>。这个疏水区对 CaM 结合域是十分重要的。

(b) 抑制结构域 在 PK-A, PK-G, PK-C 和 MLCK 等蛋白激酶活性的调控中, 抑制结构域是以假底物的方式与磷酸受体底物竞争而引起抑制作用。用人工合成含 CaM 结合域的多肽(281—309)进行实验, 发现该多肽并非与底物竞争而是与 ATP 竞争抑制 CaM-PKII 的活性。由此可见, CaM-PKII 的抑制结构域与上述各种蛋白激酶抑制结构域作用方式不同, 它不是以假底物的方式发挥作用, 而是通过阻拦 ATP 结合域抑制酶的活性。氨基酸顺序分析表明, 其抑制结构域恰好存在着一个共同的磷酸化位点(T-286, -R-Q-E-T\*-)。T-286 是该酶 Ca<sup>2+</sup> 和 CaM 依赖性磷酸化的启动位点, 而 R-283 则对其抑制结构域的功能可能具有重要作用<sup>[9]</sup>。苯甲酰甲醛选择性地修饰精氨酸, 而且对蛋白质分子上的 ATP 结合域具有一定特异性。在 Ca<sup>2+</sup> 和 CaM 存在时进行保温, 苯甲酰甲醛迅速使该酶失活, 而在 ADP 存在时, 即可防止这种失活作用, 但当 CaM 不存在时, 苯甲酰甲醛则不能使其失活<sup>[9]</sup>。因此在无 Ca<sup>2+</sup> 和 CaM 的条件下, 完整酶分子的 ATP 结合域受到严格的制约、保护, 这与上述抑制结构域干扰 ATP 结合的作用方式是一致的。

(c) 自身磷酸化位点 CaM-PKII 自身磷酸化是该酶活性调控的重要特征。实验结果证明, 其自身磷酸化的机制是以分子内方式而不是以分子间方式进行的, 其特点是自身磷酸化反应速度极为迅速, 即自身磷酸化反应出现于任何外源性底物磷酸化之前; 自身磷酸化的启动依赖 Ca<sup>2+</sup> 和 CaM。一旦启动, 自身磷酸化反应则迅速转向 Ca<sup>2+</sup> 和 CaM 非依赖性。与此同时, 其酶活性也由 Ca<sup>2+</sup> 和 CaM 依赖性转向 Ca<sup>2+</sup> 和 CaM 非依赖性, 这就是自身磷酸化的最终结果<sup>[10]</sup>。

最近已鉴定, T-286 是启动 Ca<sup>2+</sup> 和 CaM 依赖性自身磷酸化的位点, 它的磷酸化使酶活性呈现部分 Ca<sup>2+</sup> 和 CaM 非依赖性<sup>[11]</sup>。T-286 周围氨基酸顺序是-R-Q-E-T\*-。在 Ca<sup>2+</sup> 和

CaM 存在时, 合成多肽CaMK(281—309) 是该酶良好的底物, 而在 EGTA 存在时, 酶活性却很低, 推测这是由于 CaMK(281—309) 的抑制性质干扰了此多肽的磷酸化。相反, 在过量 CaM 存在时, CaMK(281—309) 的 Ca<sup>2+</sup> 依赖性磷酸化速度提高 10 倍<sup>[9]</sup>。由此得出如下结论: 在 EGTA 存在时, T-286 不能自身磷酸化, 即自身磷酸化的启动反应是依赖于 Ca<sup>2+</sup> 和 CaM 的。除 T-286 外, 可能还存在 Ca<sup>2+</sup> 和 CaM 非依赖性的第二个自身磷酸化位点, 此处被磷酸化导致该酶失去结合 Ca<sup>2+</sup>-CaM 的能力。在 α 亚基上, 这个自身磷酸化位点可能是 S-314。另外, α 亚基和 β 亚基可能还有其它一些自身磷酸化位点。

最近, Colbran 等人<sup>[3]</sup> 提出一个 CaM-PKII 调控模型。他们认为, 在缺 Ca<sup>2+</sup> 和 CaM 时, 抑制结构域抑制同一亚基上的 ATP 结合域。当 Ca<sup>2+</sup>-CaM 复合物结合到 CaM 结合域(296—309) 后, 诱导其构象的变化, 从而解除这抑制作用, 导致酶的激活。由于 ATP 的结合, T-286 进行自身磷酸化。T-286 的磷酸化, 消除了抑制结构域与 ATP 结合域间的抑制相互作用。因此, 即使 Ca<sup>2+</sup> 浓度降低至使 Ca<sup>2+</sup>-CaM 自酶分子上解离的浓度, 其活性仍不丧失, 而表现部

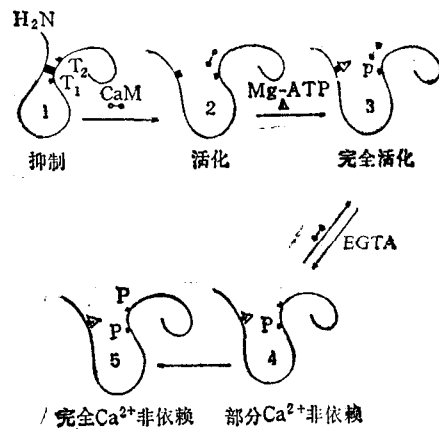


图 2 CaM-PKII 的调节假设模型

T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub> 分别代表 T-286 和 T-306/307。该模型仅代表单一亚基, 而大鼠脑 CaM-PKII 是一个多亚基组成的酶。虽然可想象一个亚基的调节结构域可能抑制相邻亚基的活性部位, 但在这个模型中保持了该酶活性调节的基本特征

分不依赖于  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{CaM}$ 。由于  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{CaM}$  复合物的解离,可引起 T-306/307 进行  $\text{Ca}^{2+}$  非依赖性的自身磷酸化,最终导致其活性完全失去对  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{CaM}$  依赖性(见图 2)。

## 6 生理功能

关于  $\text{CaM}$ -PKII 的生理功能主要来自两个方面的研究:一是测定已知功能的酶或蛋白质可否作为该酶的底物及其磷酸化后活性的变化;二是采用双向电泳和放射自显影等技术探索活细胞内的天然底物,及其生物活性。如前所述,已知许多酶或蛋白质都可作该酶的底物,而且其同工酶分布于脑等不同组织。因此,它可能在不同组织中具有不同的生理功能。目前已研究的底物大多来自哺乳动物脑组织。下面将重点讨论  $\text{CaM}$ -PKII 在哺乳动物脑组织中的生理功能。

**6.1 神经递质合成的调节** 不论是肾上腺素能神经元合成去甲肾上腺素,还是多巴胺能神经元合成多巴胺,都以摄取血液中酪氨酸作为原料。首先是在神经末梢胞浆内由酪氨酸羟化酶催化生成多巴胺。酪氨酸羟化酶是合成这两种神经递质的限速酶。虽然 PK-A, PK-C 和  $\text{CaM}$ -PKII 都能催化酪氨酸羟化酶的磷酸化,但只有被  $\text{CaM}$ -PKII 催化的磷酸化,此酶才被一种蛋白活化因子所激活<sup>[12]</sup>。另外,  $\text{CaM}$ -PKII 也能催化合成 5-羟色胺的限速酶色氨酸羟化酶的磷酸化,并进而被一种蛋白活化因子激活。因此,  $\text{CaM}$ -PKII 催化这两种酶的磷酸化,促进去甲肾上腺素、多巴胺和 5-羟色胺等神经递质的合成。

**6.2 神经递质的释放**<sup>[13]</sup> 突触蛋白 I 是神经元特有的一种蛋白质,由两个亚基构成为不对称分子。其头部与突触囊泡膜磷脂成分结合,尾部与突触囊泡膜蛋白质成分结合。后者受突触蛋白 I 磷酸化状态的调节。完全脱磷酸的突触蛋白 I 与突触囊泡呈紧密结合,其解离常数约为  $10\text{nmol/L}$ 。PK-A 和  $\text{CaM}$ -PKI 催化其头部一个丝氨酸残基的磷酸化,略增加其解离常数。相反,  $\text{CaM}$ -PKII 催化其尾部磷酸

化,使其解离常数增加 5 倍左右。突触蛋白 I 通过抑制突触囊泡的移动及其与质膜的融合来抑制神经递质的释放。因此,该蛋白在控制神经递质释放过程中起着关键性的作用。 $\text{CaM}$ -PKII 催化突触蛋白 I 尾部磷酸化后,减弱了它与突触囊泡膜蛋白的结合,促进了它自突触囊泡上的解离,因而有利于神经递质的释放。据报道,脱磷酸的突触蛋白 I 促进肌动蛋白细丝的包装作用,从而将突触囊泡埋起来,不利于它的移动。 $\text{CaM}$ -PKII 磷酸化其尾部后,解除了这种包埋作用以利于突触囊泡的移动。因此,突触蛋白 I 的磷酸化状态还调节着突触囊泡与细胞骨架之间的联结。

活体实验结果也证明  $\text{CaM}$ -PKII 促进神经递质释放。向乌贼突触前末梢微量注射脱磷酸突触蛋白 I,结果降低了突触后膜电位,减少了神经递质的释放。但是,当微量注射  $\text{CaM}$ -PKII 时,引起突触后膜电位的增加,推测是乌贼类突触蛋白 I 的磷酸化而引起突触囊泡的解离,减轻了对神经递质释放的抑制所致。

**6.3 微管的组装与拆卸**<sup>[14]</sup> 微管存在整个神经元中,它对轴浆的运输起着重要作用。微管由微管蛋白和微管连接蛋白(MAP)组成。体外实验证明 MAP-2 能迅速被  $\text{CaM}$ -PKII 催化磷酸化。脱磷酸的 MAP-2 促进微管的组装,而被  $\text{CaM}$ -PKII 磷酸化的 MAP-2 则抑制微管的组装,有利于微管的拆卸。

**6.4 胞内 cAMP 水平的调节**  $\text{CaM}$  依赖性腺苷酸环化酶催化 ATP 合成 cAMP,环核苷酸磷酸二酯酶(PDE)则催化 cAMP 降解 5'-AMP。王学荆等人<sup>[14]</sup>曾报道,牛脑所含的两种  $\text{CaM}$  依赖性 PDE 同工酶,分别由亚基分子量为 60kD 和 63kD 的同种二聚体组成。63kD 亚基同时受  $\text{CaM}$ -PKII 磷酸化与钙调磷酸酶脱磷酸化的调节。实际上,胞内 cAMP 水平至少受着以上四种酶的调控,而这四种酶活性又都依赖  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{CaM}$ 。因此,  $\text{CaM}$  通过其靶酶调节胞内 cAMP 水平时表现了一种相互拮抗的现象。为了解释这一现象,王等<sup>[14]</sup>提出了一种瞬间隔离假说(hypothesis of the tempo-

rally separated regulations)。牛脑腺苷酸环化酶和 CaM-PKII 的  $\text{Ca}^{2+}$  激活浓度低于 63kD PDE 同工酶和钙调磷蛋白磷酸酶的  $\text{Ca}^{2+}$  激活浓度。在  $\text{Ca}^{2+}$  浓度较低时,腺苷酸环化酶催化 ATP 合成 cAMP。与此同时, CaM-PKII 催化 63kD PDE 同工酶磷酸化并使其活性降低,其结果有利于 cAMP 水平的提高。随着胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的升高,非磷酸化的 63kD PDE 同工酶被激活,钙调磷蛋白磷酸酶也被激活并催化磷酸化的 63kD PDE 同工酶脱磷酸化,从而提高 PDE 活性,其结果导致胞内 cAMP 水平的降低。我们的实验表明<sup>[15]</sup>,纯化的牛脑 CaM-PKII 在以  $\text{Ca}^{2+}$  和 CaM 依赖性迅速自身磷酸化后即转向  $\text{Ca}^{2+}$  和 CaM 非依赖性自身磷酸化,结果使该酶活性失去对  $\text{Ca}^{2+}$  和 CaM 依赖性,而使 63kD PDE 磷酸化,补充了上述假说。

**6.5 突触的可塑性** 最近,Colbran 等人<sup>[3]</sup> 提出 CaM-PKII 参与突触的可塑性 (synaptic plasticity) 调节。海马突触效应的长时程增强 (longterm potentiation, LTP) 属于突触传递可塑性调节之一。所谓 LTP 是指在经短暂而高频刺激后兴奋性突触后膜电位 (EPSP) 呈现长时间持续增加的过程。LTP 一旦出现,可持续数小时,乃至数天到数周。LTP 的诱导涉及突触后  $\text{Ca}^{2+}$  内流,而这种  $\text{Ca}^{2+}$  内流是通过 N-甲基-D-门冬氨酸 (NMDA) 受体通道实现的。它的开放既需要突触前递质谷氨酸的释放,也需要突触后膜达到一定的去极化,所以它是递质依赖性和电压依赖性通道。这种电压依赖性是由于  $\text{Mg}^{2+}$  对通道的阻塞的结果。 $\text{Mg}^{2+}$  对该通道的阻塞是电压依赖的,且随膜电位的去极化而减少。实验结果表明,LTP 需要持续的蛋白激酶活性,而突触后致密体 CaM-PKII 的自身磷酸化及其继发的非  $\text{Ca}^{2+}$  依赖型的形成,可能是细胞的最佳选:第一,当胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度很低时,由于极少量的分子内自身磷酸化或新合成分子与自身磷酸化分子之间亚基的交换,使得  $\text{Ca}^{2+}$  非依赖性酶活性可能持续到超过一个激酶分子的生命。第二,向海马锥体细胞内微

量注射蛋白激酶抑制剂 H-7 或 CaM 拮抗剂卡咪唑鎓盐 (calmidazolium) 可以阻滞 LTP 的诱导。如果微量注射合成的 CaM 结合肽,既能拮抗 CaM 和抑制 CaM-PKII 自身磷酸化及其底物的磷酸化,又能阻滞 LTP 的诱导。可见,突触后细胞 CaM 和 CaM-PKII 的活化对 LTP 的诱导是必需的<sup>[16]</sup>。第三,这种非  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性激酶可能催化某些离子通道或与其相关的调节蛋白磷酸化,导致应答神经递质谷氨酸的离子通透性增加。如果 NMDA 受体通道能被该酶磷酸化并解除电压依赖性  $\text{Mg}^{2+}$  的阻塞作用,就可能激活这种离子通道。据报道, CaM-PKII 确实具有这种疏通钙通道的作用<sup>[17]</sup>。

### 参 考 文 献

- 1 Naim A C, Hemmings H C Jr *et al.* *Ann Rev Biochem.* 1985; 54: 931
- 2 Erondy N E, Kennedy M B. *J Neurosci.* 1985; 5: 3270
- 3 Colbran R J, Schworer C M, Hashimoto Y *et al.* *Biochem J.* 1989; 258: 313
- 4 Zhang G Y, Sharma R K, Wang J H. *The FASEB Journal.* 1988; 2(5): 4049
- 5 Schulman H, Lou L L. *TIBS.* 1989; 14: 62
- 6 Payne M E, Schworer C M, Soderling T R. *J Biol Chem.* 1983; 258: 2376
- 7 Soderling T R, Schworer C M, Pagne M E *et al.* *Collog INSERM.* 1986; 139: 141
- 8 Pearson R B, Woodgett J R, Cohen P *et al.* *J Biol Chem.* 1985; 260: 14471
- 9 Colbran R J, Fong Y-L, Schworer C M *et al.* *J Biol Chem.* 1988; 263: 18145
- 10 Kelly P T, Lickteig R, Shenolikar S. In: Norman A W *et al.* eds, *Calcium binding proteins in health and disease.* London: Academic Press, 1987: 180
- 11 Schworer C M, Colbran R J, Keefer J R *et al.* *J Biol Chem.* 1988; 263: 13486
- 12 Fujisawa H, Yamauchi T, Nakata H *et al.* In: Cheung W Y ed, *Calcium and cell function.* New York: Academic Press, 1984; Vol. 5: 67
- 13 Hemmings H C Jr, Nairn A C *et al.* *The FASEB Journal.* 1989; 3: 1583
- 14 Sharma R K, Wang J H. *Biochem Cell Biol.* 1986; 64: 1072
- 15 张光毅,赵升皓等,生物化学与生物物理学报. 1991;23: 423
- 16 Malenka R C, Kauer J A, Perkel D J *et al.* *Nature.* 1989; 340: 554
- 17 Hosey M M, Borsotto M, Lazdunski M. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83: 3733