

Molecular Effect and Application of Peptide Nucleic Acid. LI Xiao-xu, ZHANG Liang-ren, ZHANG Li-he (*National Key Laboratory of Natural and Biometric Drug, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*); CHEN Yao-zu (*Department of Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China*).

Abstract PNA is DNA analog in which the phosphate backbone has been replaced by (2-aminoethyl) glycine unit that is linked to the nucleotide bases *via* the glycine amino nitrogen and methylenecarbonyl linkers. PNA can bind to complementary oligonucleotides by Watson-Crick

base pairing with high thermal stability and exhibit wide biological effects including modulating the function of DNA sequence specific binding protein and modulating the transcription and translation *in vivo* or *in vitro*. Many applications have been explored for PNA as a new kind of molecular biological tools. Despite its DNA (RNA) binding properties, recent progress has shown that PNA has potential for the development of gene-targeting pharmaceuticals.

Key words peptide nucleic acid, biological effects, transcription, translation, gene modulating drugs

钙蛋白酶的结构及活性调节*

杜 敏 南庆贤

(中国农业大学食品学院, 北京 100094)

朱美君

(中国农业大学生物学院, 北京 100094)

摘要 钙蛋白酶广泛存在于各组织, 广泛表达的钙蛋白酶有两种, 钙蛋白酶 I 和钙蛋白酶 II, 它们激活所需的 Ca^{2+} 浓度不同. 这两种酶都有大、小两个亚基, 分子质量分别为 80 ku 和 30 ku. 大亚基有 4 个结构域, 小亚基由 2 个结构域构成. 新近还发现了几种组织特异表达的钙蛋白酶. 钙蛋白酶抑制蛋白是钙蛋白酶的内源抑制蛋白, 它由 5 个结构域组成, 其中 4 个为重复序列, 均具有独立抑制钙蛋白酶活性的功能. 体内钙蛋白酶活性受到严格调控, 贴膜反应可以降低钙蛋白酶对 Ca^{2+} 的依赖性, 膜磷脂头部所带的磷酸基团与激活作用有关, 自溶也可以降低对 Ca^{2+} 的依赖, 而钙蛋白酶抑制蛋白则起专一的抑制作用.

关键词 钙蛋白酶, 结构, 钙蛋白酶抑制蛋白, 活性调节

学科分类号 Q556

第一次发现钙激活中性蛋白酶 (简称钙蛋白酶, calpain) 至今已有 20 多年的历史. 在体内, 通过 Ca^{2+} 激活及自溶而表现出蛋白水解酶活性, 并通过钙蛋白酶抑制蛋白 (calpastatin) 抑制活化后的 calpain. Calpain 活性还受贴膜反应的调节, 表明 calpain 系统是一个复杂的, 高度调控的蛋白降解体系. 从目前的研究看, Calpain 的作用可能是调节胞内蛋白质的降解, 而非整个降解过程的直接参与者. 因为 calpain 主要作用对象是细胞骨架蛋白,

受体蛋白以及蛋白激酶; Calpain 可能通过对这些蛋白进行特异的局部降解而对其结构、功能进行调控. 总之, 对 calpain 的生理功能还很不清楚, 目前对 calpain 及其抑制蛋白的结构、活性调节有了初步的了解^[1].

* 国家自然科学基金 (39670548、39570535) 和国际科学基金 (International Foundation for Science, Sweden) 资助项目.

收稿日期: 1996-10-30, 修回日期: 1997-02-28

1 Calpain 结构及特性

广泛存在的 calpain 有两种, Calpain I 和 calpain II, 都由两个亚基组成, 分子质量十分相近, 但是两者表现半最高活性所需的 Ca^{2+} 浓度不同, Calpain I (又称 μ -calpain) 所需的 Ca^{2+} 为 $1 \sim 20 \text{ nmol/L}$, 而 calpain II (又称 m -calpain) 为 $250 \sim 750 \text{ nmol/L}$. 对两种 calpain 进行氨基酸组成及肽图分析发现, 它们的小亚基相同, 而大亚基是两个相关基因的产物, 两种大亚基之间存在一定的免疫交叉反应^[1].

Calpain I 和 II 的催化特性是基本一致的, 切割位点两端的氨基酸不一致表明切割位点是有多个因素决定的, 包括切割位点两端的氨基酸残基, 离切割位点稍远的氨基酸残基和底物的其他结构特性. 实验结果表明 P1 位点是精氨酸、组氨酸、酪氨酸或甲硫氨酸残基, 而 P2 位点是亮氨酸或缬氨酸残基时为最佳底物^[1].

随着人 calpain I 及 calpain II 的大亚基 cDNA 的克隆, 人们先后克隆了鸡、兔、猪、牛等的 calpain 大亚基的 cDNA. 目前, 兔、猪、牛及人的 calpain 小亚基的 cDNA 也被克隆. 比较不同来源的 calpain cDNA 发现它们的结构非常相似, 来源不同的钙激活酶的抗体之间有着高度的交叉反应^[2].

分析克隆的 calpain cDNA 序列发现其大亚基由四个结构域组成 (图 1). 其中结构域 II 是表现水解活性的关键部位, 对其研究也最为深入, 它约占大亚基氨基酸残基数的 35% 左右, 其催化活性中心由 Cys105, His262 和 Asn286 三个氨基酸残基组成^[3], 与巯基蛋白酶, 如木瓜蛋白酶、组织蛋白酶有相似性; 结构域 IV, 位于羧基端, 占氨基酸残基数的 20%, 是钙离子结合部位, 与其他钙结合蛋白如钙调素蛋白 (CaM)、原肌球蛋白 (tropinin C) 有明显的相似性, 含有四个 EF-手结构; 结构域 III, 占氨基酸残基数的 35%, 此结构域很可能与抑制蛋白或激活蛋白的结合有关,

起活性调节作用; 结构域 I, 位于氨基端, 占氨基酸残基数的 10%, 与已知蛋白质的序列都不相同, 当 calpain 激活后, 结构域 I 会发生自溶, 因此推测其可能起活性调节作用.

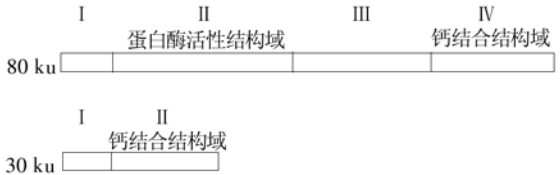


图 1 Calpain 的结构示意图

小亚基含两个结构域, 两结构域之间由一段富含脯氨酸的序列连接 (71~ 80 个氨基酸残基). 结构域 I, 富含甘氨酸 (~ 50% Gly), 其余主要为疏水性氨基酸组成, 它很可能与该酶的膜吸附特性有关. 结构域 II 和大亚基的结构域 IV 很相似, 类似于 CaM, 也有四个 EF-手结构. 基因重组实验表明小亚基的羧基端与大亚基相结合, 对形成二聚体起重要作用^[4]. 最近 Yoshizawa 等^[5]发现 calpain 经 Ca^{2+} 激活后, 其大小亚基分离, 表明大小亚基分离时, Calpain 才具活性, 进而认为小亚基主要起调节作用. Blanchard 等^[6]认为在溶液中 calpain 是以二聚体的形式存在.

除了上述广泛存在的 calpain 外, 新近又发现了组织特异表达 calpain, 称 r-calpain , 它们与广泛表达的 calpain 相似, 但又有不同的特点^[7]. 第一个发现的特异表达 calpain, r-calpain 1 , 比其他 calpain 多三个片段, 在肌肉中特异表达^[8]. 在筛选胃 cDNA 文库时又发现了两个 r-calpain 的同工酶即 r-calpain 2 和 2' , 它们主要在胃中表达, 是同一个基因不同的剪接产物^[9]. r-calpain 2 和广泛表达的 calpain 很相似, 但 r-calpain 2' 缺少钙结合结构域, 似乎有别于传统的钙激活酶的定义.

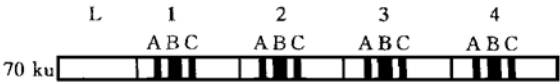


图 2 Calpastatin 的结构示意图

2 钙蛋白酶抑制蛋白的结构与功能

钙蛋白酶抑制蛋白 (calpastatin) 是胞内专一性抑制 calpain 活性的蛋白质, 它可以识别 calpain 与钙结合引起的构象变化并与之特异结合. 兔和猪的 calpastatin cDNA 首先被克隆, 由它们 cDNA 推导的氨基酸序列不同于已知的其他蛋白酶抑制蛋白质, 它们的分子质量为 77 ku. 比较不同哺乳动物 calpastatin 的 cDNA 序列发现, 它们的保守性较差^[10]. 该蛋白含有五个结构域 (图 2)^[11]. 第一个结构域即 L 结构域的功能还不太清楚, 此结构域在某些细胞的 calpastatin 中不存在, 如红血球中的 calpastatin. 第二到五个结构域是四个结构相似的重单位^[12], 每个重复单位的氨基酸残基具 20% ~ 35% 同源性. 每个重复单位含有三个保守区 (图 2)^[11], 分别为 A、B、C. 保守区 B 约含 30 个氨基酸, 其中由 Thr-Ile-Pro-Pro-X-Tyr-Arg 组成的七肽序列十分保守, 它可能是 calpastatin 起抑制作用的关键部位. 通过基因重组, 使 calpastatin cDNA 片段在大肠杆菌中表达, 发现含此保守序列的多肽片段, 即使少到 30~70 个氨基酸残基, 也能抑制 calpain 的活性^[12]. Maki 等^[13] 发现人工合成的含 TIPPXYR 的 23 个氨基酸残基或更长的短肽可以抑制 calpain 活性. 保守区 A 和 C 决定着 calpastatin 与 calpain 中 CaM 类似结构域的结合. 通过定点突变实验发现当保守区 A 和 C 中 Leu 161 和 Leu 236 被 Pro 替代时, Calpastatin 和 calpain 的亲合力将大大降低^[14]. 如果删除保守区 B, Calpastatin 虽然失去了抑制活性, 但仍可有效地与 calpain 中 CaM 类似结构域结合, 此实验有效地证实了重复序列中三个保守区所行使的功能.

3 钙激活酶活性的调节

新近证实 calpain 属于细胞内寿命较长的蛋白质^[15]. 若长时间存在于细胞质中而其活性不能得到很好的调控, 对细胞是非常有害的, 有时甚至是致死的. 为了细胞正常的生命

活动, 细胞中 calpain 的活性必然受到严格的调控. 下面简要叙述几种已经较清楚的活性调节方式.

3.1 Ca^{2+} 对 Calpain 的调节作用

Ca^{2+} 可以与 calpain 相结合, 并随 Ca^{2+} 浓度的不同, Calpain 表现出四个特性, 依其对 Ca^{2+} 浓度的依赖性, 从低往高为: a. 与亚细胞器/质膜结合, 对红细胞膜的研究表明需 $0.5 \sim 2 \mu\text{mol/L Ca}^{2+}$, 这显示在胞内, Calpain 主要结合于细胞膜上, 这样有利于 calpain 对膜蛋白和膜骨架蛋白的水解作用. Calpain 可以特定水解蛋白激酶 C、磷酸化酶激酶等而参与细胞内信息转导; b. 提高 Ca^{2+} 浓度, Calpastatin 与 calpain 结合, 这可能起到防止 calpain 被随机激活的作用; c. Ca^{2+} 浓度进一步提高将导致 calpain 构象变化而表现蛋白水解酶活性; d. Calpain 自溶^[16]. 表现蛋白水解酶活性所需要的钙离子浓度与自溶性所需的 Ca^{2+} 浓度十分相近, 因此通常把 calpain 是否发生自溶看作是 calpain 是否已被激活的标志. Saido 等^[17] 用自溶时切除的一段多肽为抗原, 制备了能区分活化和未活化 calpain 的专一抗体.

3.2 Calpain 的自溶

Calpain 在足量 Ca^{2+} 存在下能很快自溶. 自溶后, Calpain 表现活性所需的 Ca^{2+} 浓度大为降低. 目前认为, Calpain 的自溶是分子间的过程, 自溶作用是 calpain 表现活性的重要步骤. 自溶为什么会降低 calpain 对 Ca^{2+} 的依赖性目前还不清楚, 一个可能的解释是自溶移去了氨基端一段抑制酶活性的肽链而引起酶分子的构象变化^[7]. 激活后的 calpain 还可因为进一步的自溶而较快失去酶活性. 由于 calpain 在自溶后才表现活性, 因此, Calpain 可以看成是一个酶原, 这可以保证 calpain 在未被激活的情况下无活性, 而防止对细胞的伤害.

3.3 磷脂的作用

由于激活 calpain 所需要的 Ca^{2+} 浓度大于 10^{-6} mol/L , 而胞内的 Ca^{2+} 却在 10^{-6} mol/L 以下, 不足以激活 calpain. 在活体中, Calpain

如何被激活一直是一个令人困惑的问题。因此, 当发现磷脂酰丝氨酸和磷脂酰肌醇能降低 calpain 自溶所需要的钙离子浓度时, 人们便设想细胞膜对该酶有激活作用。进一步研究发现多聚磷酸肌醇盐具有更强的激活作用, 按其激活能力的大小排列是 4, 5-二磷酸磷脂酰肌醇 > 4-磷酸磷脂酰肌醇 > 磷脂酰肌醇, 显示出带负电的磷酸极性头部对激活起重要作用^[17], 由此推测当磷酸根数目大于 2 个, 其激活作用应更强。Bjore 等^[18]观察到, 在上皮生长因子的刺激下, 分布在细胞膜上的磷脂酰肌醇激酶与受体形成复合体, 促使局部高含多聚磷酸肌醇盐区的形成, 以及胞内局部 Ca^{2+} 浓度提高, 很可能起到对特定部位 calpain 的激活作用。Calpain 与磷脂结合的部位是小亚基氨基端 39 ~ 67 氨基酸残基之间的肽段^[19]。

3.4 Calpain 活化蛋白是否存在

尽管磷脂能降低 calpain 激活所需的 Ca^{2+} 浓度, 但这与细胞内 Ca^{2+} 浓度还存在较大的差异。这样, 就使人们推测是否存在一种活化蛋白, 它与 calpain 结合可以大大降低 calpain 活化所需的 Ca^{2+} 浓度。这种活化蛋白可能是一种激酶, 它使 calpain 分子的特定位点磷酸化而使 calpain 对 Ca^{2+} 的亲合力大大提高; 也可能是通过与 calpain 结合而起活化作用。而活化蛋白本身受磷酸化和去磷酸化的调节。尽管有 calpain 活化蛋白被分离的报道, 但目前对这种活化蛋白的了解还很少^[16]。

3.5 Calpain 活性的负调节

Calpastatin 是高效的, 十分专一的 calpain 活性抑制蛋白。Calpastatin 和 calpain 的结合需要 Ca^{2+} , 并且这种结合是可逆的, 即在无 Ca^{2+} 时重新分离。在大多数组织中, Calpastatin 浓度足以抑制 calpain 活性^[20]。当 calpain 被 Ca^{2+} 激活后, 如果附近有 calpastatin 存在, 将迅速与之结合, 而抑制 calpain 活性, 从而保证 calpain 对底物只进行局部的特定位点的水解, 这和 calpain 的生理功能——即调节胞内的蛋白质降解是一致的。

以上分析了 calpain 的激活和抑制。但总

的来说, 在胞内对 calpain 活性调节的具体过程还很不清楚。因为细胞内各种代谢调节的复杂性, 而 calpain 又参与了胞内许多种调节, 使对这一问题的研究难度很大。进一步的研究很可能有赖于通过重组 DNA 技术调节胞内的 calpain 的表达, 或造就一些部分肽链缺失突变的 calpain 来研究其功能; 也可通过胞外的模拟研究来进行。

参 考 文 献

- 1 Croall D E, Demartino G N. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiological Reviews*, 1991, **71** (3): 813~ 847
- 2 Emori Y, Kawasaki H, Imajoh Y *et al.* All four repeating domains of the endogenous inhibitor for calcium-dependent protease independently retain inhibitory activity. Expression of the cDNA fragment in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1988, **263** (5): 2364~ 2370
- 3 Arthur J S C, Gauthier S, Elce J S. Active site residues in m-calpain: Identification by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett*, 1995, **368** (13): 397~ 400
- 4 Minami Y, Emori Y, Imajoh-Ohmi H *et al.* Carboxyl-terminal truncation and site-directed mutagenesis of the EF hand structure domain of the small subunit of rabbit calcium-dependent protease. *J Biochem*, 1988, **104** (6): 927~ 833
- 5 Yoshizawa T, Sorimachi H, Tomioka S *et al.* Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions. *Biochem Biophys Res Com*, 1995, **208** (2): 376~ 383
- 6 Blanchard H, Li Y G, Cygler M *et al.* Ca^{2+} -binding domain VI of rat calpain is a homodimer in solution: Hydrodynamic, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies. *Protein Sci*, 1996, **5** (3): 535~ 537
- 7 Saido T C, Sorimachi H, Suzuki K. Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological/pathological involvement. *FASEB J*, 1994, **8** (11): 814~ 822
- 8 Sorimachi H, Kinbara K, Kimura S *et al.* Muscle-specific calpain, p94 responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connexin through IS2, ap94 specific sequence. *J Biol Chem*, 1995, **270** (52): 31158~ 31162
- 9 Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. A novel tissue-specific calpain species expressed predominantly in the stomach comprises two alternative splicing products with and without Ca^{2+} -binding domain. *J Biol Chem*, 1993, **268** (26): 19476~ 19482
- 10 Lee W J, Ma H, Takano E *et al.* Molecular diversity in amino-terminal domains of human calpastatin by exon skipping. *J Biol Chem*, 1992, **267** (12): 8437~ 8442
- 11 Yang H O, Ma H, Takano E *et al.* Analysis of calcium-dependent interaction between amino-terminal conserved region of calpastatin function domain and calmodulin-like domain of μ -calpain large subunit. *J Biol Chem*, 1994, **269**

- (29): 18977~ 18984
- 12 Ma H, Yang H Q, Takano E *et al.* Amino-terminal conserved region in proteinase inhibitor domain of calpastatin potentiates its calpain inhibitory activity by interacting with calmodulin-like domain of the proteinase. *J Biol Chem*, 1994, **269** (39): 24430~ 24436
 - 13 Maki M, Bagei H, Hamaguchi K *et al.* Inhibition of calpain by asynthetic oligopeptide corresponding to an exon of the human calpastatin gene. *J Biol Chem*, 1989, **264** (32): 18866~ 18869
 - 14 Takano E, Ma H, Yang H Q *et al.* Preference of calcium-dependent interactions between calmodulin-like domains of calpain and calpastatin subdomains. *FEBS Lett*, 1995, **362** (1): 93~ 97
 - 15 Zhang W L. The major calpain isozymes are long-lived proteins, design of an antisense strategy for calpain depletion in cultural cells. *J Biol Chem*, 1996, **271** (31): 18825~ 18830
 - 16 Goll D E, Thompson V F, Taylor R G *et al.* Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin? *BioEssays*, 1992, **14** (2): 549~ 556
 - 17 Saido T C, Shibata M, Takenawa T *et al.* Positive regulation of μ -calpain action by polyphosphoinositides. *J Biol Chem*, 1992, **267** (34): 24585~ 24590
 - 18 Bjore J D, Chan T O, Antezak M *et al.* Activated type I phosphatidylinositol kinase is associated with the epidermal growth factor (EGF) receptor following EGF stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87** (10): 3816~ 3820
 - 19 Arthur J S C, Crawford C. Investigation of the interaction of μ -calpain with phospholipids: capain calpain-phospholipid interactions. *Biochem Biophys Acta (Protein Struct Mol Enzymol)*, 1996, **1293** (2): 201~ 206
 - 20 Kumamoto T, Kleese W C, Cong J *et al.* Localization of the Ca^{2+} -dependent proteinases and their inhibitor in normal, fasting, and denervated rat skeletal muscle. *Anat Rec*, 1992, **232** (1): 60~ 77

The Structure and Activity Regulation of Calpain. Du Min, NAN Qing-xian (College of

Food Science, Agricultural University of China, Beijing 100094, China); Zhu Mei-jun (*College of Biological Science, Agricultural University of China, Beijing 100094, China*).

Abstract There are two kinds of ubiquitous calpains, calpain I and calpain II, differing in their Ca^{2+} requirements for half maximum activities. Both calpains have a large subunit and a small subunit, with molecular weights of 80 and 30 ku respectively. Large subunit is composed of 4 domains. Small subunit is composed of 2 domains. Recently, several tissue specific calpains were discovered, adding to the complexity of calpain system. Calpastatin is an endogenous suppressor of calpain, which can bind to activated calpain specifically and made them inactive. There are 5 domains in calpastatin, domain L and 4 repeated domains numbered 1 to 4 which are responsible for their inhibitory effects. Calpain activity is restrictively regulated in living cells. Membrane attachment reaction can low the Ca^{2+} requirement of calpain to be activated. The negatively charged phosphate groups on the polar head of membrane phospholipids are important for that activation. Autolysis also can low the Ca^{2+} requirement of calpain.

Key words calpain, structure, calpastatin, activity regulation

哺乳动物性别决定和性反转*

徐晋麟

(上海交通大学生物科学与技术系, 上海 200240)

徐沫

(浙江大学高分子系, 杭州 310027)

摘要 目前已知 *SRY* 仅是涉及性别决定过程的基因之一。近年来又发现和克隆了许多可能参与性腺分化与发育的基因, 如副中肾抑制基因 *MIS*, 也称抗副中肾激素基因 *AMH*; *SRY* 相关基因 *SOX9*;

* 国家自然科学基金资助项目 (39370551). 收稿日期: 1996-11-06, 修回日期: 1997-04-02