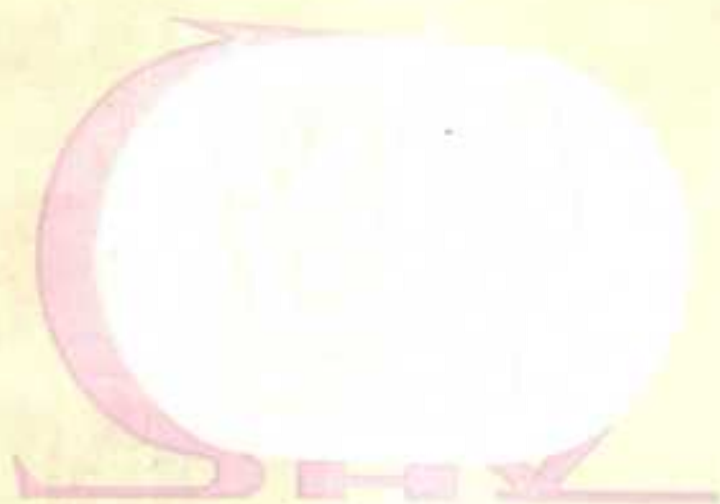


1219872



钙调节蛋白专辑

SHENGWUJIAOXUEYICONG

生物化学译丛

第 5 辑

生物化学译丛(第五辑)

(钙调节蛋白专辑)

上海第一医学院 编

上海科学技术文献出版社出版

(上海高安路六弄一号)

新华书店上海发行所发行

江苏省宜兴县南漕印刷厂印刷

开本 787×1092 1/16 印张 4.25 字数 102,000

1982年5月第1版 1982年6月第1次印刷

印数: 1—3,100

书号: 15192-38 定价: 0.55元

《科技新书目》23-241

前 言

钙离子在生物体中的重要作用早在七年前的一次环腺苷酸的国际学术会议上就曾有人以漫画的形式指出：“钙离子临于王位，环腺苷酸、环鸟苷酸等都受其指挥。”这一说法当时即引起了轰动。现在已经非常清楚地知道，在复杂的细胞生命活动中，如收缩、运动、噬食、分泌以及分裂等行为中，无不包括钙离子的调节作用。随着生物学的发展，一些与钙离子相关的调节蛋白也相继发现。钙调节蛋白是一种广泛分布于所有组织中的细胞内钙受体，它与钙具有高度专一性和高度亲和性的结合能力。它不仅直接影响细胞活动，而且也可以通过影响钙本身浓度和其它一些重要细胞调节物起间接调节作用。因此，研究钙离子及其相关的调节蛋白在细胞中的作用，对生物化学、药理学、生物学、免疫学和临床医学，都有重要意义。为了介绍国外这方面的研究情况，本辑选译了十篇文章，供有关同志参考。

上海第一医学院生化教研室

1981年6月

目 录

细胞内作为 Ca^{++} 受体的钙调节蛋白	(1)
钙调节蛋白：一种多功能的蛋白质	(13)
钙调节蛋白：细胞内的钙受体	(17)
钙和蛋白质的磷酸化反应	(23)
钙调节蛋白在细胞调节中起着关键作用	(31)
Ca^{++} 依赖性蛋白酶	(40)
肌肉收缩的 Ca^{++} 受体蛋白	(47)
Ca^{++} 的流通	(54)
线粒体 Ca^{++} 转移的机制和调节	(59)
Ca^{++} 受体蛋白的药理学	(64)

细胞内作为 Ca^{++} 受体的钙调节蛋白

垣内史朗

引言

生物体液中的离子成分与海水中的相似,因而认为生命起源于太古的海水,这不是没有缘故的。钙也是这种情况。在人血清中钙的浓度约为 10 毫克/100 毫升 ($2.5 \times 10^{-3}M$), 细胞外的含量一般也是如此。其中约半数解离为离子(以下用 Ca^{++} 表示), 其余的是结合的形式(主要与蛋白质结合)。可是细胞内 Ca^{++} 的含量一般低于 $10^{-6}M$ 。下面还提到, 在细胞兴奋时, Ca^{++} 的含量大大地上升, 可达到 $10^{-5}M$, 而一旦去除引起细胞兴奋因素, Ca^{++} 含量就会迅速回到原来的水平。这是由于 Ca^{++} 能通过细胞膜向细胞外, 或向细胞内细胞颗粒(线粒体和 SR 样蛋白)内转移。前一过程由 Ca^{++} 泵 ATP 酶 (Ca^{++} , Mg^{++} -ATPase) 起作用。相反, 细胞内 Ca^{++} 浓度的上升, 则是由于细胞外流入 Ca^{++} (膜上 Ca^{++} 通道开放) 以及由颗粒中释放 Ca^{++} 的结果。

对于细胞内 Ca^{++} 保持低浓度的生物学意义虽尚待今后研究, 但是有两点现在已经了解: 其一, 细胞内 Ca^{++} 浓度若超过 $10^{-4}M$, 经过一定时间, 细胞将向不可逆的死亡道路上发展; 这时对 Ca^{++} 依赖的蛋白酶可能起一定作用; 其二, 细胞内外的浓度差可起生物情报的作用。本文将对后一问题作一些介绍。

环 AMP、环 GMP 是细胞内的传递情报系统, 这点虽已是众所周知, 但从生命历史上看, 作为情报系统, Ca^{++} 的起源更悠久。现在假若发现了环 AMP 的缺乏症, 用现代医学技术还可能使病人维持生命, 但是作为情报系统的 Ca^{++} , 如果出现异常, 则必将直接引起死亡。这是因为 Ca^{++} 与多种根本的生命现象的调节有关。不用说肌肉(骨骼肌、心肌、平滑肌)的收缩的调节与钙有关, 其他如白细胞的活化(运动与吞食), 血小板的活化(变形与分泌), 淋巴细胞的活化(分裂的开始), 肥大细胞的活化(组织胺的分泌), 通过儿茶酚胺 α 受体及乙酰胆碱受体的细胞的应答性, 细胞的分泌现象(exocytosis), 神经末梢递质的释放, 神经的轴索流, 细胞的分裂过程(特别是染色体的移动)等等, 都是与 Ca^{++} 调节有关的例子。今后在这方面的报道将会更多。

粗略一看就可以知道, 钙的研究是一个包括生物化学、药理学、生物学、免疫学及临床医学各科在内的重要题目, 但至今未被充分注意, 这是由于这方面的实验非常困难。然而由于近年来几种细胞内 Ca^{++} 受体蛋白的发现和鉴定, 以及蛋白质的磷酸化和生物膜研究等基础知识的充实, 这方面的问题才开始受到重视。

本文叙述的 Ca^{++} 受体蛋白, 根据 Kretsinger 的 E-F 手学说认为, 其分子内有几个结合 Ca^{++} 的部位, 从分子进化上来看, 可能有一组共同起源的蛋白质。它们能与 Ca^{++} 结合而发生构象变化, 并把这种变化传递给其他蛋白, 以调节后者的机能, 进而参与细胞机能的调节。在最主要的 Ca^{++} 受体蛋白中, 有肌钙蛋白 C、钙调节蛋白、parvalbumin、肌球蛋白

表1 Ca^{++} 受体蛋白的比较

Ca^{++} 受体蛋白	氨基酸残基数	分子量	pI	$\text{Ca}^{++}(\text{Mg}^{++})$ 结合部位		
				Ca^{++}	$\text{Ca}^{++}, \text{Mg}^{++}$	合 计
骨骼肌肌钙蛋白 C	159	17,965	4.4	2	2	4
心肌肌钙蛋白 C	161	18,459				2~3
钙调节蛋白(脑)	148	16,680	3.9	4	0	4
parvalbumin(鲤鱼)	108	11,489	4.5	0	2	2

轻链。它们的概况列于表 1。

在上面提到的各种蛋白质中,肌钙蛋白 C 最早被发现,即在 1960 年上半年由江桥等发现,并命名为肌钙蛋白。以后又阐明了它是由三种亚基(肌钙蛋白 T, I, C)组成的。T 是分子量为 37,000, 难溶于水的碱性蛋白质, I 是分子量为 28,000 的碱性蛋白质, C 是分子量为 18,000 的可溶的酸性蛋白质。肌钙蛋白分布于脊椎动物的横纹肌中,它是借 Ca^{++} 的存在来调节收缩的物质。关于它的作用机制如今已逐渐了解。

肌钙蛋白 I 有抑制收缩的作用,而 C 则起去抑制的作用。 Ca^{++} 通过与肌钙蛋白 C 的可逆结合而影响肌钙蛋白 I。在有肌钙蛋白 T 存在时,与 Ca^{++} 结合的肌钙蛋白 C 对 I 的作用加强,这就起了 Ca^{++} 存在时肌肉收缩,而 Ca^{++} 不存在时肌肉弛缓的调节作用。以后对此机能已清楚的 Ca^{++} 受体蛋白认为就是钙调节蛋白,下节将加以叙述。parvalbumin, 肌球蛋白轻链也存在于肌肉中,但它们的机能还不清楚。

钙 调 节 蛋 白

Kretsinger 根据本蛋白质的机能 (Calcium-dependent Modulation protein) 提议命名为 Calmodulin, 即钙调节蛋白。

图 1 为不同组织钙调节蛋白一级结构的比较。如图 1 所示,三者(心肌肌钙蛋白 C, 脑

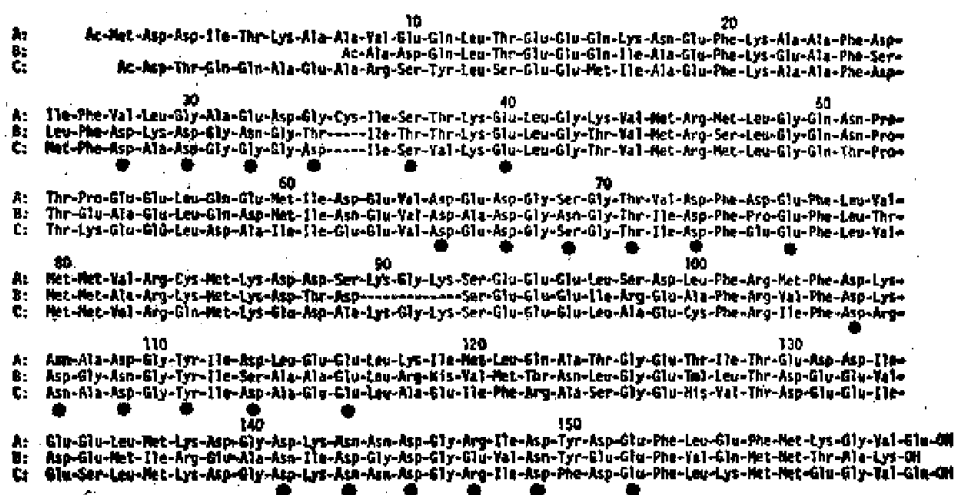


图1 肌钙蛋白 C 与钙调节蛋白一级结构的比较

△: 牛心肌肌钙蛋白 C; B: 牛脑钙调节蛋白; C: 兔骨骼肌肌钙蛋白 C; * 为 Ca^{++} 结合的部位

钙调节蛋白, 骨骼肌钙蛋白 C) 有极相似的结构, 并且在其内部都有 4 个相同的区域, 各能结合 1 个 Ca^{++} , 共计有 4 个配位(但是心肌钙蛋白 C 有 1 个区的结构不完整, 在这一区不能与 Ca^{++} 配位)。从这些分子结构看来, 可能最初的大小只有现在分子的 $1/4$, 残基数少于 40 的原始型的多肽。由于分子进化, 对应的遗传子经过两次重复, 而成为现在看到的蛋白质结构(图 2)。但是 parvalbumin 是原始型的 3 倍。关于这一组蛋白质与 Ca^{++} 的结合的部位, Kretsinger 的 E-F 手学说现认为是可信的。他得到了鲚鱼肌肉的 parvalbumin 的结晶, 经 X-射线衍射分析结果证明在 108 个氨基酸残基中有 52 个形成了 6 个 α -螺旋, 分别命名为 A~F。 Ca^{++} 只配位于 A—B 两个螺旋的连接部位(形成圈的地方)以及 E—F 两个螺旋的连接部位(圈的地方)的 6 个不同的位置上。因为肌钙蛋白 C 和钙调节蛋白还没有得到结晶, 故不能进行 X-射线衍射分析, 它们主要是从一级结构的相似来决定 Ca^{++} 的结合部位的。

在比较结构时, 还发现有一个特点, 即在钙调节蛋白中存在有三甲基赖氨酸残基。曾认为这个残基与这种蛋白质特有的酶活性有关, 但是从植物中得到的钙调节蛋白虽没有这个残基, 却仍有酶活性, 从而否定了上述推论。

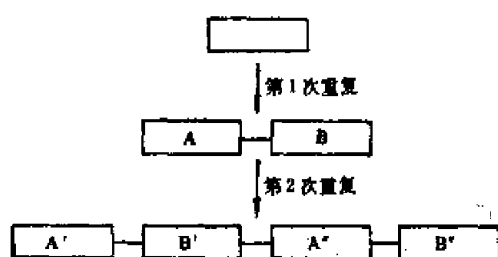


图 2 遗传子的重复

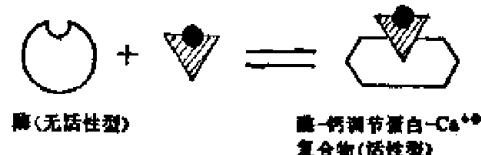
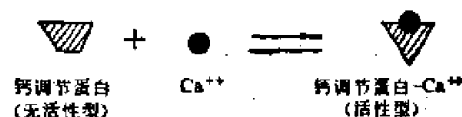


图 3 钙调节蛋白使酶活化的机理

从紫外光吸收及圆偏光的变化证明, 钙调节蛋白与 Ca^{++} 结合时发生构象变化, 因为 α -螺旋量由于结合了 Ca^{++} 而增多。肌钙蛋白 C 结合 Ca^{++} 时也见到同样的变化, 这时 Ca^{++} 结合的效果可影响到肌钙蛋白 I, 而钙调节蛋白与 Ca^{++} 结合后再可与各式各样的酶结合而使之活化。换言之, Ca^{++} -钙调节蛋白-酶的复合物是酶的活性型, 解离的酶则是酶的无活性型。这是作者首先用磷酸二酯酶证实的, 在第二年, Cheung 等也提出了完全相同的报道。现将有关此作用机理的模式描述于图 3。

钙调节蛋白使酶活化的作用

图 3 表示钙调节蛋白活化各种酶的一般机理。反应对 Ca^{++} 浓度 ($10^{-3} \sim 10^{-5} M$ 的生理范围内) 的依赖关系是可逆的, 若添加 EGTA, 反应向左移, 变为无活性的酶。利用这个反应特性可进行酶的提纯。用钙调节蛋白作为配体做亲和层析, 在 Ca^{++} 存在下吸附酶, 然后用含 EGTA 的溶液进行洗脱。这样纯化了磷酸二酯酶、红细胞膜的 Ca^{++} -ATP 酶、肌球蛋白轻链激酶。兹将各个酶分述如下:

1. 磷酸二酯酶

并非所有的磷酸二酯酶都能被 Ca^{++} 和钙调节蛋白活化。已报道在各式各样的组织中存在有多种磷酸二酯酶, 而能被活化的仅是其中之一, 即属 PDEI 型。这个酶的分子量推测约 15 万, 虽对环 AMP 及环 GMP 两者都能分解, 但当底物浓度低时, 分解环 GMP 的作用远远大于环 AMP (环 GMP 的 $K_m = 2\mu M$)。在 Ca^{++} 和钙调节蛋白的作用下, V_{max} 增加, K_m 减小。

这个酶的活性发现在脑中最大, 肝脏、肾脏、心肌等组织也能见到, 移植的实验性肝癌细胞中也存在, 但并非在所有生物材料中都有。例如肾上腺髓质、睾丸的间质细胞、鸡的红细胞、海胆卵、海蘑菇、蚯蚓、藻菌、梨形四膜虫等虽有钙调节蛋白, 但没有受它活化的磷酸二酯酶。因此, 有理由说钙调节蛋白的生物学意义不只是活化磷酸二酯酶的因子。

可以利用 Ca^{++} 存在下这个二酯酶能与钙调节蛋白结合的性质, 从脑、心肌提纯这个酶。从脑组织中得到的酶由分子量为 61,000, 59,000 以及 15,000 的三个亚基组成, 其中分子量 59,000 的亚基是催化亚基。

2. 腺苷酸环化酶

关于这个酶受 Ca^{++} 和钙调节蛋白激活的最初报道是由 Brostrom 等提出的。他们用脑组织颗粒部分的 1% Lubrol 抽提液作为酶。大约 1 年以后, Cheung 等也得到了同样的结果。这就是说, 仍然认为能以颗粒本身作为酶, 而且它的

依赖于 Ca^{++} 和钙调节蛋白的激活作用受 NaF, GTP 或儿茶酚胺的强化。

但是, 这里有一个问题, Ca^{++} -钙调节蛋白对正反两个方向的反应(环腺苷酸环化酶的合成作用及磷酸二酯酶的分解作用)都有作用。进一步仔细地研究, 发现 Ca^{++} 也能抑制脑中腺苷酸环化酶。更奇怪的是, 依赖于 Ca^{++} 的磷酸二酯酶在哺乳动物组织中分布极广泛, 相反, 依赖于 Ca^{++} -钙调节蛋白的腺苷酸环化酶仅在脑中、神经胶质瘤、肾上腺等等少数细胞中发现。针对此疑问, 最近 Piasik 等的实验结果是很有趣味的。

他们在精确地控制实验体系中的 Ca^{++} 浓度的条件下进行酶活性测定, 结果发现脑颗粒部分的腺苷酸环化酶的活性与 Ca^{++} 钙调节蛋白浓度关系出现两峰性(图 4), 即在低 Ca^{++} 浓度下, 酶开始被活化(在 $0.08\mu M \text{Ca}^{++}$ 时, 被活化了 50%), 再继续增加 Ca^{++} , 则引起抑制作用($0.5\mu M$ 时抑制 50%); 在肾上腺中也得到相似的结果。 $0.3\mu M$ 左右的 Ca^{++} 引起磷酸二酯酶活化(活化 50%), 此时腺苷酸环化酶反应已进入抑制区。这一实验说明, 脑中可能有由激素和 Ca^{++} 这两相互干扰的情报体系所组成的非常奇妙的体系。例如, 不论 Ca^{++} 浓度过低或过高, 细胞内都有不易引起环腺苷

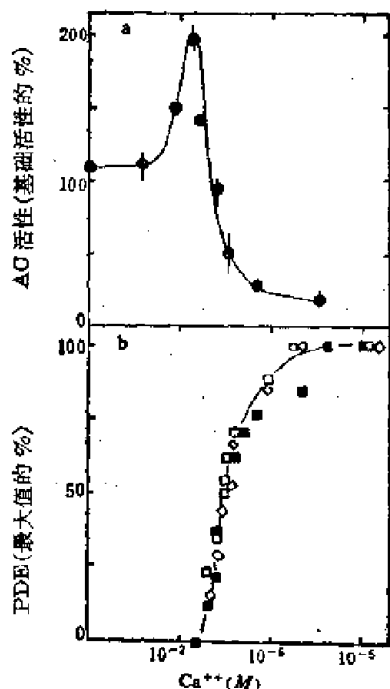


图 4 脑腺苷酸环化酶(AC)与磷酸二酯酶(PDE)受 Ca^{++} 活化的作用

a. 脑颗粒部分的腺苷酸环化酶活性
b. 脑可溶部分的磷酸二酯酶的活性

所组成的非常奇妙的体系。例如, 不论 Ca^{++} 浓度过低或过高, 细胞内都有不易引起环腺苷

酸积蓄的可能性(意味着 Ca^{++} 有允许作用)。如果当激素刺激细胞,同时发生膜的去极化作用,则意味着细胞内的环腺苷酸浓度一旦上升,随着 Ca^{++} 浓度的上升($\rightarrow$ 磷酸二酯酶的活化及腺苷酸环化酶的失活),又会急速地减小。 Ca^{++} 对环腺苷酸浓度起调节器的作用。他们认为, Ca^{++} -钙调节蛋白对腺苷酸环化酶的基本作用是抑制作用,只有在脑以及少数的其他组织中,例外地可见到起活化作用的例子。

8. 肌球蛋白轻链激酶

肌球蛋白是双头的分子,由两个 H 链($20 \text{万} \times 2$)及位于头部的四个 L 链(g 链)构成。L 链有三种,兔骨骼肌的肌球蛋白由 L_1 (2.4 万),两个 L_2 (2.0 万)以及 L_3 (1.6 万)构成(图 5)。心肌的肌球蛋白有两类 L 链,各由两个 g_1 或 g_2 形成。从结构上看,肌球蛋白应列入 Ca^{++} 受体蛋白的范畴。英国的 Perry 等发现,这个肌球蛋白的轻链(实际上指 L_2),在有 ATP 存在时,可借特异的酶(肌球蛋白轻链激酶)起磷酸化反应。在骨骼肌、心肌中,这种肌球蛋白轻链的磷酸化有什么意义现在还不清楚。许多研究工作者认为,在血小板、输精管平滑肌、肌纤维母细胞、鸡的砂囊、平滑肌等等许多非横纹肌组织中,存有代替肌钙蛋白的肌动球蛋白调节机构。上面许多例子中都提到肌球蛋白的轻链的磷酸化作用需要生理浓度的 Ca^{++} 。

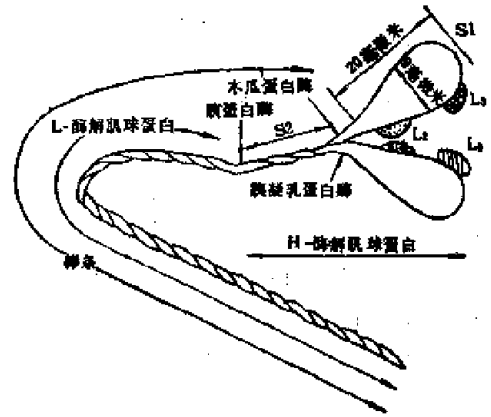


图 5 肌球蛋白分子

在 1977 年有报道指出,在催化这个反应的肌球蛋白轻链激酶分子中,分子量约 10 万及 2 万的两个成分是必要的,而且在日本(骨骼肌)及美国(平滑肌)的报道中又进一步提出,2 万分子量的成分就是 Ca^{++} 结合蛋白。第二年上两组工作者均报道这个成分就是钙调节蛋白。由于使用钙调节蛋白作为配体来吸附 Ca^{++} 的亲和层析,可以用 EGTA 洗脱来纯化酶,因此, Ca^{++} -钙调节蛋白对肌球蛋白的轻链激酶的活化机制可能如图 8 所示。

除上述组织外,在肾培养细胞(BHK-21)和脑中也发现有依赖于 Ca^{++} -钙调节蛋白的肌球蛋白激酶,这种酶可能广泛分布于非肌肉的组织中。原来,肌球蛋白、肌动蛋白等收缩蛋白存在于许多非肌肉组织中,可以相信它们与白细胞、血小板以及多种细胞功能有关。假使依赖于 Ca^{++} -钙调节蛋白的肌球蛋白激酶参与肌动球蛋白体系活性(表现于肌动球蛋白 ATP 酶)的调节,那么这个激酶在解释细胞内 Ca^{++} 的调节作用方面是很重要的。今后的研究进展必须重视。这个酶的底物特异性是很狭的。以前 Waisman 等报道,这个酶也可以催化组蛋白和磷酸化酶 b 的磷酸化,但这很可能是混有其他的酶(可能是磷酸化酶 b 激酶)。

4. 磷酸化酶 b 激酶

众所周知,磷酸化酶受环 AMP 体系激活。但是,关于它和 Ca^{++} 的关系直至 1965 年由于 Posner 等的实验才开始有所了解。实验证明,大鼠及蛙骨骼肌受电刺激时,虽然环 AMP 的浓度不上升,但磷酸化酶 b 激酶的活性增加。后来小沢等发现 $10^{-8} \sim 10^{-5} \text{M}$ 的 Ca^{++} 能

调节肌肉磷酸化酶 b 激酶的活性。这是最早提出生理浓度的 Ca^{++} 能调节酶活性的报道, 数年后, Krebs 等确认, 在血小板、平滑肌等组织中的磷酸化酶 b 激酶也有同样的现象。

磷酸化酶 b 激酶不仅受到因环 AMP 的蛋白质磷酸化酶的催化起磷酸化反应而被激活, 而且还受到 Ca^{++} 的激活; 而 Ca^{++} 的作用是较重要的, 不管酶有无磷酸化(不论是活性的或无活性型)均可被 Ca^{++} 激活, 然而无 Ca^{++} 时, 即使磷酸化了的磷酸化酶 b 激酶(活性型), 仍不呈现活性。这一活化的分子作用机理到 1978 年才被阐明。这个酶是由 α (145,000 道尔顿), β (128,000 道尔顿), γ (45,000 道尔顿) 以及 δ (17,000 道尔顿) 四种亚基组成, 即为 $(\alpha\beta\gamma\delta)_4$ —1,340,000 道尔顿的分子。并已进一步阐明 δ 亚基就是钙调节蛋白。 Ca^{++} 与 δ 亚基相结合, γ 亚基是催化亚基, α 和 β 亚基是抑制它的活性的调节亚基。 α 和 β 亚基在依赖于环 AMP 的蛋白质磷酸化酶的作用下, 进行磷酸化, 而失去它的抑制作用, δ 亚基与 Ca^{++} 的结合似乎也有去抑制的作用。

在这以后, 还阐明了一些复杂的事情。在这个酶的 δ 亚基(钙调节蛋白)与 Ca^{++} 结合以后, 还可以再同第二个钙调节蛋白相结合, 并使酶活性呈现数倍地上升。对于第二个钙调节蛋白的结合作用, 图 3 所列的通式也是适用的。用 EGTA 能很易使其与酶分离。肌钙蛋白 I 和三氟过吡嗪可抑制酶的活性。但是作为钙调节蛋白的 δ 亚基不是图 3 的典型, 似乎有肌钙蛋白 C 那样的结合作用。因此单用 EGTA 或 8M 尿素不能从酶上分离出来, 而必需用 EGTA 和尿素共同处理才能分离。

第二个钙调节蛋白有可能用肌钙蛋白 C 代替。但此时用量要比钙调节蛋白约大 200 倍。然而比较这两种蛋白质在细胞内的存在量, 则就不能否定肌钙蛋白 C 在体内的作用。不管怎样, 在 Ca^{++} 与 ($\rightarrow$ 肌钙蛋白) 结合时, 肌肉的收缩和肌肉的能量代谢(磷酸化酶 b 激酶的活性)同时受到 Ca^{++} 的调节, 这是完全合理的。对此, 儿茶酚胺—环 AMP 的调节也有这样的作用。

5. 糖原合成酶激酶

糖原合成酶被磷酸化后转变为无活性型(正确的说, 从不需 6-磷酸葡萄糖的 I 型或 a 型转变为需 6-磷酸葡萄糖的 D 型或 b 型), 这个磷酸化反应不仅由依赖于环 AMP 的蛋白质磷酸化酶所催化, 而且还可被别的磷酸化酶(激酶)催化。最近阐明后一激酶活性是依赖 Ca^{++} 和钙调节蛋白的。进而在骨骼肌中也发现有这种作用的磷酸化酶 b 激酶。

6. Ca^{++} 泵 ATP 酶(红细胞膜)

已经知道红细胞膜上的 Ca^{++} , Mg^{++} -ATP 酶是作为 Ca^{++} 泵的 ATP 酶。此酶已纯化, 它的活化需要细胞内的一种可溶性蛋白质, 而且两组美国工作者同时认为这个使酶活化的蛋白质就是钙调节蛋白。继续用红细胞膜的外流样品, 以及包含 Ca^{++} , Mg^{++} -ATP 酶重组的脂质体进行试验, 证实钙调节蛋白确实与 Ca^{++} 泵的调节有关。

根据更详细的资料说明, 每一个红细胞平均有 4500 个结合钙调节蛋白的位点, 1 个位点可结合相当于 3,000 微克分子无机磷/分钟的酶活性。用 TritonX-100 从红细胞溶出 Ca^{++} , Mg^{++} -ATP 酶, 再用以钙调节蛋白作为配体的亲和层析法等, 大约可将其纯化 150 倍, 它的分子量为 125,000, 比活性为 3.8 微克分子无机磷/毫克分钟。

7. 突触膜的 Ca^{++} , Mg^{++} -ATP 酶

在脑匀浆的超离心沉淀分离法得到的突触膜组分中,发现有钙调节蛋白依赖性的($\text{Ca}^{++} + \text{Mg}^{++}$)ATP 酶。为了观察钙调节蛋白的添加效应,膜碎片必须用含 EGTA 的溶液充分洗涤,不然因有内源性的钙调节蛋白,添加效应不会出现(EGTA 洗以前的内源性钙调节蛋白的量为 3.6 微克/毫克膜蛋白,洗以后为 0.9 微克/毫克膜蛋白)。这个 ATP 酶的生理意义还不大清楚,可能与 O^{++} 摄入膜有关(有萆酸或无萆酸时的摄取)。

8. 植物的 NAD 激酶

在高等植物的代谢中, NADP 比 NAD 有更重要的作用。在豌豆中发现一种为催化 $\text{NAD} \rightarrow \text{NADP}$ 反应的 NAD 激酶所需的激活剂。以后又确认它就是钙调节蛋白。在高等植物中,除豌豆外,花生、大麦中也含有。这种钙调节蛋白与哺乳动物中的钙调节蛋白性质稍有不同;然而动物与植物的两种钙调节蛋白对 NAD 激酶(植物)和磷酸化酶激酶(动物)的激活作用却可以定性地交叉起作用。

9. 磷脂酶 A_2 (血小板)

至今关于这个酶还只有一篇报道。用血小板膜碎片进行实验,观察到磷脂酰胆碱生成花生四烯酸。当添加 Ca^{++} 及钙调节蛋白时,生成量增加,但是单独分别加入 Ca^{++} 或钙调节蛋白,也能使生成量增加,若两者一同加入,生成率的提高不多,这因为受到内源性钙调节蛋白或 Ca^{++} 的影响。还发现,用完整的小血小板做实验,添加钙调节蛋白使促凝血素 B_2 的生成增加。这一结果说明钙调节蛋白通过了膜起作用,或是对膜外侧起作用,不管怎样都有点不可思议。

钙调节蛋白的其它作用

前一节清楚地阐述了钙调节蛋白的靶酶。本节再谈谈钙调节蛋白的其它作用。

1. 蛋白质磷酸化

前节叙述了钙调节蛋白能促进肌球蛋白轻链激酶,磷酸化酶 b 激酶和 NAD 激酶等酶的活性。下面,再讨论几个尚未完全弄清的问题。

1) 触突膜蛋白的磷酸化

Greengard 实验室发现,将脑匀浆微粒体部分的蛋白质(分子量为 51,000 和 62,000 道尔顿)用 EDTA 充分清洗后,再加入 Ca^{++} 和钙调节蛋白,微粒体部分的蛋白的磷酸化将得到显著促进。一般认为,此时并没有外源性酶存在。磷酸化的显著促进,应是内源性的膜内结合的激酶的作用。即使用低渗处理神经终板,所获得的膜组分,也可得到完全同样的结果。所以认为,不论是酶还是基质蛋白,都结合于触突膜上。

Greengard 等还报道, Ca^{++} 和环 AMP 都可促进触突膜中蛋白 I_a (分子量为 8,600 道尔顿)和蛋白 I_b (分子量为 80,000 道尔顿)的磷酸化。但是,这种情况的发生是否有钙调节蛋白的参与,尚不清楚。由 Ca^{++} 与由环 AMP 促进磷酸化时,蛋白质接受磷酸化的部位似

乎稍有不同。

另一方面, Delorenzo 实验建立了用精制的触突颗粒的实验体系。在此体系中, 加入 Ca^{++} (及 Mg^{++}) 时, 从触突颗粒中释放去甲肾上腺素以及颗粒结合蛋白 (DPH-L 和 DPH-M) 的磷酸化, 两者是平行发生的。并在以后的报告中证明, 上述情况的发生必需要有钙调节蛋白的存在, 此时 Ca^{++} 浓度稍高于 $9.5 \times 10^{-5} M$ 。

他们还发现, 将完整的神经终板置于高 K^+ 、无定形藜芦硷、东莨菪醇蛇毒中去极化时, 随着 Ca^{++} 的摄取而发生去甲肾上腺素的释放和颗粒结合蛋白的磷酸化。

2) 微粒体膜蛋白的磷酸化(脂肪组织)

有报告认为从脂肪组织中分离的微粒体膜结合蛋白(分子量为 54,000 道尔顿)的磷酸化也依赖于 Ca^{++} 调节蛋白的促进。这同样是由于内源性激酶的存在, 但与肌球蛋白轻链激酶和磷酸化酶 b 激酶都不一样。今后一定还可以在各种组织中看到这种例子。

3) 可溶性蛋白的磷酸化(脑)

山内和藤尺发现, 脑匀浆的离心上清液用 25~55% 饱和度的硫酸铵沉淀时, 沉淀中有几种蛋白, 它们可在 Ca^{++} 和钙调节蛋白的存在下接受磷酸化。这是由于存在于同一沉淀物中的内源性激酶所引起的。接受磷酸化的主要蛋白, 用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱显示, 其分子量相当于 45,000 道尔顿和 60,000 道尔顿。还发现在此条件下色氨酸单氧化酶也发生磷酸化和活化。

4) 受体磷酸蛋白(phospholamban)的磷酸化

已知受体磷酸蛋白(分子量 22,000 道尔顿)存在于心肌微粒体中, 同样是具有调节心肌微粒体 Ca^{++} 泵 ATP 酶活性的蛋白。由依赖于环 AMP 的蛋白磷酸化酶所致的磷酸化, 系经过 Ca^{++} 泵 ATP 酶活性的升高来加速心肌微粒体 Ca^{++} 的摄取而表现出来。一般认为, 这是儿茶酚胺的强心作用的分子机制。

最近发现, 这种受磷酸蛋白能被 Ca^{++} 和钙调节蛋白活化, 而且是通过一种激酶所致的磷酸化而产生的。这种激酶与微粒体膜结合, 类似于磷酸化酶 b 激酶, 但又与它明显不同。从分子水平上看, 依赖于 Ca^{++} -钙调节蛋白的激酶和依赖于环 AMP 的蛋白磷酸化酶, 受磷酸化的部位是不同的。在受磷酸蛋白分子中存在两类磷酸化, 即依赖于 Ca^{++} -钙调节蛋白的和依赖于环 AMP 的两种。其中前者似乎起着根本性的作用, 就是说, 如果没有前者, 仅靠后者不能使 Ca^{++} 泵 ATP 酶活化。后者仅仅是在前者的基础上起放大作用。受磷酸蛋白的这两类磷酸化的存在, 即使在灌流心肌实验中也可以用不同的磷酸化抑制剂(羟乙基四培拉辛基丙基三氟甲基噻唑)加以证实。

2. 分泌

早已知道 Ca^{++} 在细胞分泌过程中的必要性。在此, 当然要考虑到这种分泌过程会有钙调节蛋白参与。胰脏分泌胰岛素, 特别是由葡萄糖引起的胰岛分泌胰岛素过程与钙调节蛋白有关这件事, 最近已由三个实验室通过吩噻嗪的抑制作用加以证实。也有人报道实验性糖尿病大鼠脂肪组织中钙调节蛋白浓度减少。

3. 微管的解聚

如后面所述, 由于能够看到钙调节蛋白重迭地存在于各个细胞有丝分裂时期所出现的

纺锤丝中,这就提示,依赖于 Ca^{++} 的微管解聚有钙调节蛋白参与。用大鼠脑中所获得的微管进行实验观察,也提示了这种实际情况。酒井实验室也有同样看法,甚至认为钙调节蛋白实际上存在于微管二聚体内,为 Ca^{++} 依赖性结合。仅存在一个问题是在微管的解聚方面,当肌钙蛋白 C 浓度低时,解聚效果明显,但其机理尚不够清楚。

4. Dynein ATP 酶

Vanaman 实验室曾报道,钙调节蛋白大量(0.5 毫克/30 毫升细胞)存在于梨形鞭毛虫内,其中有相当量存在于鞭毛。而且,14S dynein ATP 酶和 Ca^{++} 依赖性地结合着,由此提示了 Ca^{++} -调节蛋白参与控制鞭毛的运动。

5. 精子的精虫头粒

钙调节蛋白可以非常高的浓度存在于精子的精虫头粒(达总蛋白的 13.9%),由此可提示钙调节蛋白在受精时的作用。

6. 肌动球蛋白 ATP 酶

曾有报道脱敏肌肉肌动球蛋白 ATP 酶的活性,可被肌钙蛋白 I 所抑制。钙调节蛋白的这一作用依赖于 Ca^{++} 。钙调节蛋白依赖 Ca^{++} 和肌钙蛋白 I 结合,可通过电泳判断。其次,钙调节蛋白还可与肌钙蛋白 T 结合,即在肌钙蛋白复合体中(肌钙蛋白 C、I、T),肌钙蛋白 C 可被钙调节蛋白取代。而且,体外实验表明,通过杂交复合体,肌肉的肌动球蛋白 ATP 酶活性可受到相当程度的调控。实际上,肌肉中有钙调节蛋白存在。但一般认为,在体内肌动球蛋白可受肌钙蛋白的调节,不需钙调节蛋白参与。

7. 钙调节蛋白结合蛋白

以上,由钙调节蛋白所参与各个系统均已阐述,但钙调节蛋白的生理作用的讨论尚未详尽,仍留有许多很不清楚的问题。研究钙调节蛋白的未知生理机能的一个有利途径是研究钙调节蛋白结合蛋白。遗憾的是直到现在,所发现的全部钙调节蛋白结合蛋白,其机能仍不清楚。

1. 可溶性钙调节蛋白的结合蛋白

1976 年 Wang 和 Desai 曾报道,在脑中存在一种蛋白,它能抑制钙调节蛋白活化磷酸二酯酶。其后,将其从脑组织中进行精制并将其分为耐热性和热敏感性两种。前者分子量为 70,000 道尔顿,后者为 85,000 道尔顿。后者又是由 A 亚基(分子量 60,000 道尔顿)和 B 亚基(分子量 14,500 道尔顿)组成的 AB_2 分子。

另外, Klee 等对热敏感性钙调节蛋白结合蛋白进行了纯化,最后命名为 Calineurin。按照她的报告,该蛋白内 A 亚基(分子量 61,000 道尔顿)和 B 亚基(分子量 15,000 道尔顿)以 1:1 组成(所以总分子量为 76,000 道尔顿)。特别有趣的是, B 亚基也是一种 Ca^{++} 结合蛋白,这种蛋白存在于脑组织内,具有调节脑细胞内 Ca^{++} 浓度的作用。

Cheng 等同样从脑组织中精制了这种蛋白,并制成抗体,研究该蛋白在脑组织内的分布情况,获得了这种蛋白主要在触突后膜和树突的微管上分布图。这和钙调节蛋白的分布大致相同。

另一方面,英国 Perry 报告,在脑组织中有分子量为 140,000, 77,000, 61,000 以及 22,000 道尔顿的钙调节蛋白结合蛋白,并提示其中分子量为 22,000 道尔顿的钙调节蛋白结合蛋白就是髓鞘碱性蛋白。

尽管在睾丸中钙调节蛋白的含量高,但对其作用尚不完全清楚。最近研究提示睾丸中存在有分子量为 88,000 道尔顿和 41,000 道尔顿两种钙调节蛋白结合蛋白,前者为耐热性,后者为热敏感性。

2) 颗粒结合性钙调节蛋白结合蛋白

从脑组织中提取钙调节蛋白时,在溶液中含 Ca^{++} 条件下,每 1 克脑组织中有将近 100 微克钙调节蛋白仍旧残留于颗粒部分(用 EGTA 匀浆离心沉淀,上清液中提取的钙调节蛋白为 300~400 微克/克脑组织),这是由于钙调节蛋白依赖 Ca^{++} 结合于颗粒部分,成为颗粒结合性钙调节蛋白结合蛋白。用放射性标记的钙调节蛋白研究颗粒结合性钙调节蛋白结合蛋白的分布,结果发现其在脑组织中、其次肾上腺中含量较高。同时,在脑组织中轴突膜部分的比活性较高这一点,亦说明了这种结合蛋白和分泌机能可能有关。最少在心肌、骨骼肌、脾脏、肾脏、肝脏等所有研究过的组织中,也均存在这种蛋白,虽然其含量较少,但也许具有更为一般的机能。

钙调节蛋白在细胞内的存在

哺乳动物组织中钙调节蛋白存在的量,大致如表 3 所示,以脑、肾上腺、垂体等分泌性组织中较多。一般来说,在脑中各部位含量均高,可达全部可溶性蛋白的 1% 以上。

表 2 脑钙调节蛋白结合蛋白

蛋 白	分 子 量 ($\times 10^{-6}$)	存 在 量	
		毫克/千克	微摩尔钙调节蛋白当量/千克
可溶性钙调节蛋白	17	300~400	17~24
热敏感性钙调节蛋白结合蛋白 (Calneurin)	85	52	0.61
耐热性钙调节蛋白结合蛋白	70	0.2	0.003
磷酸二酯酶	150	10	0.07
颗粒结合性钙调节蛋白结合蛋白			4~6

在肌细胞内的肌原纤维中,肌钙蛋白 C 与肌动蛋白以 7:1 之比整齐地结合,但钙调节蛋白在细胞内的存在形式还不太清楚。首先,一般认为它可能与酶结合的形式存在。其中与磷酸化酶 b 激酶的 δ 亚基结合,不易解离(参考上文钙调节蛋白使酶活化的作用之 4),而这种结合形式占肌肉中钙调节蛋白的 40%。其次,如上文钙调节蛋白的其它作用之 7 所述,在钙调节蛋白结合蛋白中,颗粒结合性钙调节蛋白的结合,是随细胞内 Ca^{++} 浓度的变化而呈现可逆性的结合或解离。其次,在细胞内还有用 EGTA 抽提也不能将其从颗粒部分分离出来的所谓紧密结合型钙调节蛋白。表 3 中作为颗粒结合性所表示的部分相当于紧密结合型部分。这部分用去污剂处理方能从颗粒部分溶解下来,可是一旦溶解下来后,其性质就同原来存在于可溶性部分的钙调节蛋白没有很大差别。最近,中村等人从触突膜部分分离出一种钙调节蛋白样蛋白,其氨基酸组成等性质似与钙调节蛋白稍有差异。

表3 钙调节蛋白的组织分布

组 织		可 溶 性		颗 粒 结 合 性			合 计
		单位/克组织	单位/毫克蛋白	单位/克组织	单位/毫克蛋白	%	单位/克组织
大 白 鼠	大脑皮质	409±5	16.7	153±7	2.53	27	562
	睾丸	401±13	11.4	49±5	1.37	11	450
	小脑	293±25	10.8	116±13	1.59	23	409
	肺	90±8	1.30	52±5	0.73	37	142
	前列腺	87±4	3.06	18±1	0.24	17	106
	肾上腺	84±1	4.37	21±5	0.63	20	106
	肝	74±2	0.84	26±3	0.29	26	100
	肾	47±6	0.84	39±3	0.43	46	86
	脾	28±3	0.44	49±5	0.95	63	78
	心肌	28±2	0.75	14±2	0.20	33	42
	骨骼肌	28±3	0.87	10±0.4	0.21	26	38
牛	大脑皮质	406±27	15.9	152±23	2.03	27	558
	尾状核	264±17	15.2	181±13	3.11	41	445
	海马	277±16	14.3	120±3	2.29	30	397
	脑垂体前叶	175	3.77	36	0.30	17	211
	肾上腺髓质	152	3.61	30.4	0.39	17	182
	肾上腺皮质	127	3.33	20.7	0.25	14	148
	脑白质	52±3	4.92	未测	未测	—	52
	视床下部	163±13	8.27	47±7	0.92	23	210
	脑垂体后叶	158	3.38	27	0.41	14	185

1单位相当于1微克精制的脑钙调节蛋白。

鸡胚胎芽纤维细胞中钙调节蛋白的量(占全部可溶性蛋白的0.3%),随着Rous肉瘤病毒的翻译,可增加到1.32%。因为由病毒感染时仅为0.36%,和对照值比较变化不太大,所以一般认为这种增加可能与增殖有关。这点也得到其他研究组的确定,而且仅为量的变化,钙调节蛋白的质未变。也有报告提及人的乳房癌组织中钙调节蛋白浓度增加。

以上为增殖旺盛的细胞中所显示出的钙调节蛋白浓度增加的例子。使用实验性肝癌组织,将细胞匀浆离心的上清液和沉淀两部分进行定量检测,结果上清液中钙调节蛋白浓度升高,而沉淀中浓度则降低。同样,用培养的中国仓鼠卵巢细胞(OHO细胞)进行观察,随着细胞密度的增加,上清液中钙调节蛋白浓度也增加,沉淀中浓度也降低。这些观察极有趣,值得进一步研究。以前Costa小组发表的资料提到膜结合性钙调节蛋白可随着膜磷酸化而趋向上清部分,但它在实验条件上存在着种种疑点,有必要进行补测。

为了研究钙调节蛋白在细胞内的存在形式,有必要利用其抗体作组织化学测定。但对此蛋白的抗血清的制备是极为困难的,在国际上仅有二篇报告。此外,也有使用DNB(1-氟-2,4-二硝基苯)化的蛋白而成功的例子。大概因为这是生物界广泛分布着的一种监护蛋白(Conservative蛋白),所以难以产生抗体。Means等根据荧光抗体法所得的结果,认为分裂中的细胞,在有丝分裂中期和后期,观察到钙调节蛋白集合在半纺锤处,即使用松胞素B(阻碍肌动蛋白)处理细胞,亦不能改变钙调节蛋白的分布。而用colcemid(阻碍微管)处理时,其分布即被彻底搅乱。因此,钙调节蛋白可能与微管结合。但是,分裂装置中的微管也存在于极与染色体之间及分裂期的染色体之间,相比之下,钙调节蛋白仅限于极和染色体

之间的半纺锤处。从这一事实以及微管的解聚对 Ca^{++} 的依赖性与钙调节蛋白有关这方面的资料(见上文钙调节蛋白的其它作用之 3), 又可提出如下假设, 即钙调节蛋白在极点附近通过微管的解聚, 调节染色体的移动, 而否定了钙调节蛋白向分裂沟的分布。在静止期的细胞, 钙调节蛋白分布在细胞质中的应激纤维(stress fiber)里, 否定了向核的分布。其它研究组提出肝细胞核、细胞膜等也有钙调节蛋白的分布。给入考的松时, 肾上腺皮质细胞核的分布增多, 这也许是由于制备抗血清时所用的抗原不同。在肌肉中钙调节蛋白多分布于肌原纤维 I 带和糖原颗粒上。在脑中可从神经纤维中检出。在触突后膜和树突的微管中分布量也较多。

结 语

本文以细胞内钙调节蛋白及其作为钙受体的作用为重点作了介绍。自 1970 年发现该蛋白以来, 几年内, 国际上对它的研究迅速增加。例如, 在本文所引用的 166 篇文献中, 1976 年为 13 篇, 1977 年 20 篇, 1978 年 29 篇, 1979 年 40 篇, 今年(1980 年)迄 4 月份左右已有 23 篇。

何开玲、张在和译自《代谢》17(8): 1201~1214, 1980, 林钧材校

(上接第 53 页)

用), 每分子肌球蛋白上减少 1 个钙结合量。由于除去 EDTA, 再加 Mg 和调节轻链, Ca 感受性又可复活, 故非分子变性所致。EDTA 处理而去感受的肌球蛋白, 不管有无 Ca, 皆有高的肌动球蛋白 ATP 酶活性, 这说明调节轻链几乎与肌钙蛋白一样, 能抑制收缩反应, 对 Ca 去抑制的调节类型起调节作用。而且在有 EDTA 时, 温度上升, 残余的调节轻链虽也脱出, 但 ATP 酶活性不变, 而丧失 Ca 结合能力。

以上所见虽然初步显示了 Ca^{++} 能作用于调节轻链, 但至今尚无 Ca 作用于轻链的事实, 似乎是作用在重链上, 可能是通过调节轻链而改变重链的结构, 影响 Ca 的结合。

海扇的肌球蛋白分子与脊椎动物相同, 是带有 2 个活性部位(S1)的双头状。用蛋白酶处理分离的肌球蛋白 S1, 也能在试管内调节肌钙蛋白体系。这样处理海扇肌球蛋白 S1, 虽然保留了与 Ca 结合的能力, 但其 Ca 感受性已消失。由于除去分子尾部杆状部分的双头 II 酶解肌球蛋白, 仍有活性, 故有时也认为双头结构有重要性。但最近, 除去双头之一的单头肌球蛋白也显示 Ca 感受性, 作为活性部位 S1 与杆状部分连接点的重要性, 因此而受到注意。调节轻链存在于连接点附近也暗示可发挥其机能。虽然在海扇的横纹肌中几乎没有肌钙蛋白, 而有原肌球蛋白, 但是在肌球蛋白的 Ca 调节中却不需要原肌球蛋白。

Ca^{++} 不仅在肌肉收缩, 而且作为细胞运动的控制因子也受到注意。各种组织中广泛存在的钙调节蛋白, 在一定程度上代行了肌钙蛋白或是滑肌蛋白机能的事实, 说明此类运动的钙控制细胞生物学将是今后的方向之一。

李茂深译自《代谢》17(8): 1215~1223, 1980, 林钧材审

钙调节蛋白:一种多功能的蛋白质

Jean L. Marx

继重组 DNA 于七十年代初问世以来,钙调节蛋白 (Calmodulin) 是细胞生物学领域里最惊人的发现之一。它存在于所有的真核细胞中,在许多细胞活动中(诸如分裂,运动乃至分泌等)起着枢纽作用。

钙调节蛋白的作用是作为 Ca^{++} 的细胞内媒介。很久以来就认为 Ca^{++} 与很多基本的调节有关,例如,当神经细胞或肌细胞受到刺激时,或当卵子受精时,最初发生的情况之一就是细胞内游离 Ca^{++} 浓度短暂而又显著地增加。 Ca^{++} 浓度的增加是一种信号,以使细胞产生适当的效应,如肌肉收缩或神经化学递质释放。同样,许多激素也可触发其靶细胞内 Ca^{++} 浓度短暂升高。此外, Ca^{++} 还参与控制细胞运动,包括细胞分裂时染色体的拉开及推动精子和许多单细胞移行的鞭毛或纤毛的摆动。正因为 Ca^{++} 的活性是如此广泛,因此 Howard Rasmussen 在 1970 年就已提出 Ca^{++} 是细胞对许多刺激产生应答反应的“第二信使”,正如环 AMP 是许多激素的第二信使一样。

尽管已有大量证据可说明 Ca^{++} 在细胞调节方面的作用,但在钙调节蛋白发现之前,对于 Ca^{++} 是如何产生多种效应的却所知甚少。

新近的且仍在发展的理论认为:钙调节蛋白是一种细胞内 Ca^{++} 的受体,当 Ca^{++} 浓度因某种刺激而增加时,它能同 Ca^{++} 结合,从而引起钙调节蛋白分子形状明显改变。这种钙调节蛋白- Ca^{++} 复合物能同几种酶里的任何一种酶结合,使酶激活,启动了对刺激产生反应的生化变化。钙调节蛋白不仅能以这种直接的方式影响细胞活动,而且尚能通过影响 Ca^{++} 本身的浓度以及细胞内其它重要调节物(包括环 AMP 的浓度)而间接地影响细胞活动。>

在早年曾发现钙调节蛋白是一种特殊酶的激活剂,也有发现它是一种钙结合蛋白。钙调节蛋白曾被称为激活剂蛋白或钙依赖调节蛋白。由于它有调节钙对细胞的作用, Wai Yiu (George) Cheung 首先将它定名为“钙调节蛋白”,该名称现已被普遍公认。

第一个被认为与钙调节蛋白有关的酶是催化环 AMP 与环 GMP 等环核苷酸分解的酶,即 3', 5'-核苷酸磷酸二酯酶。大约在 10 年以前, Cheung 发现从脑组织制备得到的一种磷酸二酯酶,在未被一种蛋白质激活时,只显示很小的活性。几乎同时, Kakiuchi 又发现一种没有 Ca^{++} 就不能发挥作用的脑磷酸二酯酶,该酶也被一种蛋白质因子所激活。Jerry Wang 后来发现,这种蛋白质因子原来就是 Cheung 所发现的蛋白质,当即指出这种激活剂就是一种钙结合蛋白,从此开始了钙调节蛋白的研究史。

钙调节蛋白既可激活产生环 AMP 的酶,也可激活破坏环 AMP 的酶,但可能并非如此,有人提出磷酸二酯酶分解环 GMP 比分解环 AMP 更为有效。倘若如此,两种酶的同时激活可导致 [环 AMP]/[环 GMP] 比值增加,推测这一比值的改变对调节某些细胞活动包括细胞分裂,可能比核苷酸的绝对浓度更为重要。