

钙 激活蛋白酶与 基础研究

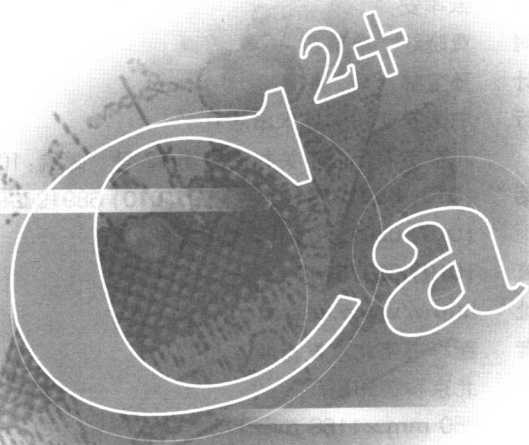
常 泓 编著



中国农业科学技术出版社

钙 激活蛋白酶与 基础研究

常 泓 编著



中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

钙激活蛋白酶与基础研究 / 常泓编著. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2006. 12

ISBN 7-80233-193-5

I. 钙… II. 常… III. 蛋白酶—研究 IV. Q556

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 003793 号

- 责任编辑 张孝安
责任校对 贾晓红 康苗苗
整体设计 孙宝林 马 钢
出版发行 中国农业科学技术出版社
北京市海淀区中关村南大街 12 号 邮编: 100081
电 话 (010) 68919704 (发行部) (010) 68919708 (编辑室)
(010) 68919703 (读者服务部)
传 真 (010) 68975144
网 址 <http://www.castp.cn>
经 销 者 新华书店北京发行所
印 刷 者 北京科信印刷厂
开 本 850 mm × 1168 mm 1/32
印 张 5.625
字 数 130 千字
版 次 2006 年 12 月第 1 版 2006 年 12 月第 1 次印刷
定 价 20.00 元

❖ 版权所有·侵权必究 ❖

内容简介

钙激活蛋白酶系统包括钙激活蛋白酶 (calpain)、钙激活蛋白酶抑制蛋白 (calpastatin) 和钙激活蛋白酶激活蛋白 (calpain activator)。该系统是高度可调的、且依赖于 Ca^{2+} 的蛋白质水解酶系统。钙激活蛋白酶的研究始于 1964 年, 钙激活蛋白酶抑制蛋白的研究始于 1976 年, 而钙激活蛋白酶激活蛋白的研究始于 1982 年。钙激活蛋白酶系统是畜牧学、医学、肉类科学领域的热门研究课题。

Calpain 是一种钙激活中性半胱氨酸内肽酶 (EC 3.4.22.17), 分布于所有脊椎动物细胞中, 在果蝇属和寄生物细胞中也发现了此酶, 但在植物细胞中却尚未提取到。虽然不同生物细胞中的钙激活蛋白酶的结构略有不同, 但是, 钙激活蛋白酶的结构都是由大小两个结构域组成。

Calpain-I 和 calpain-II、CANP、CDP I 和 CDP II 都是曾用于表示 calpain 系统的蛋白质名称。1976 年和 1981 年先后纯化得到两种依赖于 Ca^{2+} 的蛋白酶; 1989 年, Murachi 推荐了这两种钙激活蛋白酶与它们的抑制蛋白的名称; 1982 年, DeMartino 等首次纯化得到钙激活蛋白酶的激活蛋白。两种钙激活蛋白酶命名为 m-calpain 与 μ -calpain, 此命名法能反映出钙激活蛋白酶在体外激活时所需 Ca^{2+} 浓度的不同, 目前已得到广泛认可。抑制蛋白的名称是 calpastatin, 激活蛋白的名称是 calpain activator。

Calpain-calpastatin-calpain activator 系统的体外研究表明, calpain 仅裂解蛋白质有限的专一位点, 产生大的多肽片段, 而不是分解成小肽或氨基酸。该系统在许多细胞骨架蛋白的结合与分

解中起一定作用，尤其对依附于质膜或亚细胞结构的细胞骨架纤维部位。Calpain 降解作用较彻底，导致横纹肌的肌原纤维 Z 盘裂解，从而使肌节部位断裂。因此，Calpain 系统在动物机体屠宰后，肌肉蛋白的水解在引起肉的嫩化中起相当重要的作用。它还参与居间纤维的分解、神经丝蛋白的水解、表皮作用因子受体的降解、成肌细胞融合、磷酸化酶 b 激酶和蛋白激酶 C 的活性、类固醇激素结合蛋白的转化、血小板的凝集等。Calpain 系统不仅参与上述正常的细胞内级联信号转导，也与机体内发生的各种病理状态，如局部缺血、老年性痴呆症、白内障、肌肉萎缩、脓毒、切东二氏综合征、炎症、关节炎、疟疾等各种疾病相关联。

迄今为止，Calpain-calpastatin 系统已成为最广泛和深入研究的蛋白酶系统之一，美国、日本、法国、以色列、英国、加拿大、意大利等国家的科学家都对它产生了浓厚的兴趣。我国关于钙激活蛋白酶系统的研究始于 20 世纪 90 年代，但是，至今国内还没有该类书籍出版。

本书对钙激活蛋白酶系统 (calpains) 的研究现状进行了概述，对该酶系统各个成员的分布、结构、功能和特性等进行了介绍，并就钙激活蛋白酶系统与肉品质的关系，对肉的嫩化作用及与各种疾病的关系进行了阐述和总结。在本书的撰写过程中作者还将近年来钙激活蛋白酶系统的科研成果进行了融合和整理，是一本该方面研究的系统性图书。

本书适合于生物学、畜牧学、兽医学、食品科学、医学领域的研究生、科研人员及肉类科学工作者和其他科学爱好者阅读。

目 录

第一章 导言	(1)
第一节 钙激活蛋白酶的概述	(1)
第二节 钙激活蛋白酶系统的研究现状	(2)
第二章 钙激活蛋白酶系统的组成及其结构 与特性	(4)
第一节 钙激活蛋白酶	(4)
一、钙激活蛋白酶的研究进展	(4)
二、钙激活蛋白酶的分布与结构	(5)
三、肌肉组织中的 calpain-calpastatin 系统	(11)
四、钙激活蛋白酶的特性	(19)
第二节 钙激活蛋白酶抑制蛋白	(23)
一、钙激活蛋白酶抑制蛋白的研究进展	(23)
二、钙激活蛋白酶抑制蛋白的结构	(23)
三、钙激活蛋白酶抑制蛋白的特性	(24)
第三节 钙激活蛋白酶的调节机理	(26)
一、钙离子对 calpains 的调节作用	(26)
二、Calpains 的自溶	(27)
三、磷脂的作用	(28)
四、Calpains 活性的负调节——calpastatin	(29)
五、钙激活蛋白酶是与膜结合、发生自溶而 发挥蛋白酶活性的吗?	(30)

六、钙激活蛋白酶是受 Ca^{2+} 和钙激活蛋白酶抑制蛋白调节的吗?	(35)
第四节 钙激活蛋白酶激活因子	(39)
一、钙激活蛋白酶激活因子的研究进展	(39)
二、钙激活蛋白酶激活因子的结构	(42)
三、钙激活蛋白酶激活因子对钙激活蛋白酶的激活特性	(43)
第三章 钙激活蛋白酶系统与肉品质性状	(49)
第一节 牛肉的品质性状	(49)
第二节 影响畜禽肉品质的因素	(50)
一、肉本身的因素	(51)
二、屠宰前的影响因素	(55)
三、宰后的影响因素	(59)
第三节 有关牛肉的肉用性状的基因	(62)
一、有关牛肉的肉用品质基因标记的概述	(62)
二、一些牛肉品质候选基因的概述	(63)
第四节 钙激活蛋白酶家族基因的研究进展	(67)
一、概述	(67)
二、Calpain 家族与 Ca^{2+} 的关系	(67)
三、Calpain 家族的结构	(68)
四、牛 calpain 家族基因的研究现状	(69)
五、Calpain 家族的研究前景	(72)
第五节 钙激活蛋白酶与肉的品质	(72)
一、概述	(72)
二、钙激活蛋白酶系统与肉品质的关系	(73)

第四章 钙激活蛋白酶与肉的嫩化	(82)
第一节 提高肉的嫩度是肉类工业的重要课题	(84)
一、肉品在宰后过程中的变化	(86)
二、肉嫩化的方法及机理	(93)
第二节 钙激活蛋白酶系统是动物宰后促进肌肉 嫩化的重要酶系统	(103)
一、宰后肉嫩化的机制：酶假说与钙理论	(103)
二、内源蛋白酶在肉嫩化中的作用	(108)
三、钙激活蛋白酶系统是动物宰后促进肌肉 嫩化的重要酶系统	(114)
第三节 研究 calpains 系统要着眼于研究钙激活 蛋白酶激活因子	(116)
一、研究 calpains 系统为什么要着眼于研究钙 激活蛋白酶激活因子	(116)
二、研究 calpain activator 的意义	(118)
三、对 calpain activator cDNA 进行克隆和表达 的意义	(119)
四、钙激活蛋白酶激活因子克隆和表达的研究 进展	(120)
第五章 钙激活蛋白酶系统与相关疾病	(122)
第一节 钙激活蛋白酶与肌肉营养不良	(124)
一、肌肉营养不良的发病机理	(124)
二、“Calpain 病理”特征	(125)
第二节 钙激活蛋白酶与眼部疾病	(127)
一、LEC 凋亡是白内障形成的细胞学基础	(128)

二、钙激活蛋白酶的激活在白内障发生机制中的作用	(128)
第三节 钙激活蛋白酶与老年性痴呆症	(131)
一、老年性痴呆症的发病机理	(131)
二、 Ca^{2+} 的生理功能和 $[\text{Ca}^{2+}]$ 稳态的调节	(132)
三、老年性痴呆、神经细胞钙超载与谷氨酸的兴奋性神经毒性作用	(133)
四、细胞内超载激活 calpain 破坏细胞结构蛋白质	(135)
五、钙激活蛋白酶影响细胞内的神经纤维缠绕	(135)
第四节 钙激活蛋白酶与 II 型糖尿病	(136)
一、钙激活蛋白酶-10 的结构和功能	(136)
二、钙激活蛋白酶-10 与 II 型糖尿病的作用	(138)
第五节 钙激活蛋白酶与脑缺血疾病	(143)
第六节 Calpain 与脑外伤、脊髓损伤、脱髓鞘性疾病等的神经元退变	(144)
一、钙激活蛋白酶与脑神经元退变	(144)
二、钙激活蛋白酶的脑保护作用	(146)
第七节 钙激活蛋白酶与其他疾病	(147)
一、钙激活蛋白酶对肌肉营养不良和伤口愈合的功能	(147)
二、钙激活蛋白酶对类风湿性关节炎的作用	(148)
参考文献	(150)

第一章 导 言

钙激活蛋白酶系统包括钙激活蛋白酶 (calpain) (Guroff, 1964; Huston, 1968; Ikeda 等, 1986)、钙激活蛋白酶抑制蛋白 (calpastatin) (Cottin 等, 1981; Murachi 等, 1981; Murakami 等, 1981) 和钙激活蛋白酶激活蛋白 (calpain activator) (DeMartino 等, 1982; Takeyama 等, 1986)。钙激活蛋白酶系统是高度可调的、且依赖于 Ca^{2+} 的蛋白质水解酶系统。

第一节 钙激活蛋白酶的概述

钙激活蛋白酶 (calpain) 是一种钙激活中性半胱氨酸内肽酶 (EC 3.4.22.17), 分布于所有脊椎动物细胞中, 在果蝇属和寄生物细胞中也发现了这种酶 (Croall 和 Demartino, 1984, 1991, Saido 等, 1994), 但在植物细胞中却尚未提取到 (Wolfe 等, 1989)。

Calpain-I 和 calpain-II、CANP、CDPI 和 CDP II 都是曾用于表示钙激活蛋白酶系统的蛋白质名称。1976 年和 1981 年先后纯化得到两种依赖于 Ca^{2+} 的蛋白酶; 1989 年, Murachi 推荐了这两种钙激活蛋白酶与它们的抑制蛋白的名称; 1982 年 DeMartino 等首次纯化得到钙激活蛋白酶的激活蛋白。两种钙激活蛋白酶命名为 m-calpain 与 μ -calpain, 此命名法能反映

出钙激活蛋白酶在体外激活时所需 Ca^{2+} 浓度的不同 (Suzuki, 1991), 目前已得到广泛认可。其抑制蛋白的名称是 calpastatin (Hurachi, 1989), 激活蛋白的名称是 calpain activator。

对 Calpain-calpastatin-calpain activator 系统的体外研究表明, calpain 仅裂解蛋白质有限的专一位点, 产生大的多肽片段, 而不是分解成小肽或氨基酸。这些蛋白酶是高度可调、且依赖于 Ca^{2+} 的蛋白水解酶系统复合体。该系统在许多细胞骨架蛋白的结合与分解中起一定作用, 尤其对依附于质膜或亚细胞结构的细胞骨架纤维部位。Calpain 降解作用较彻底, 导致横纹肌的肌原纤维 Z 盘裂解, 从而使肌节部位断裂。因此, calpain 系统在动物机体屠宰后, 肌肉蛋白的水解引起肉的嫩化中起相当重要的作用。它还参与居间纤维的分解、神经丝蛋白的水解、表皮作用因子受体的降解、成肌细胞融合、磷酸化酶 b 激酶和蛋白激酶 C 的活性、类固醇激素结合蛋白的转化、血小板的凝集 (Fox 等, 1983) 等。Calpain 系统不仅参与上述正常的细胞内级联信号转导, 也与机体内发生的各种病理状态, 局部缺血、老年性痴呆症 (Saito 等, 1993)、白内障、肌肉萎缩、脓毒、切东二氏综合征、炎症、关节炎、疟疾等各种疾病相关联 (Azarian 等, 1993; Saidoai, 1994; Nagao 等, 1994; Mimori 等, 1995; Balcastro 等, 1998)。

第二节 钙激活蛋白酶系统的研究现状

迄今为止, calpain-calpastatin 系统已成为最广泛和深入研究的蛋白酶系统之一, 为此美国、日本、法国、以色列、英

国、加拿大、意大利等国家的实验室已投入了长达几十年的精力。目前，人们虽已掌握了其酶促作用机理和结构特性，但有关 calpain、calpastatin 和 calpain activator 的结构与功能间的关系及其生理机能还不完全清楚。Calpains 分子的多样性与动物进化中的结构、功能过渡、体内调控活件的机理，以及有关 calpain-calpastatin-calpain activator 系统在机体内参与的各种生理、病理作用吸引了大量的研究者，尤其是医学界的注意，成为当今研究的一个热点。目前，国际定期召开有关 Calpain 的研究会，有关于 Calpain 的网址为：

<http://ag.arizona.edu/calpains/>。

目前，关于 calpain 系统的研究主要取得的工作包括下列四方面：

第一，克隆并在 *Escherichia coli* 中和杆状病毒（baculovirus）中成功地表达 m-calpain 基因。

第二，在无 Ca^{2+} 的条件下得到了结构域 VI 以至整个 m-calpain 的晶体结构。

第三，在无脊椎动物组织中鉴定了一些类 calpain 的 Ca^{2+} 激活蛋白酶。

第四，动物试验表明，calpain 对于机体的存活是必要的，但是，如果只缺少一种 calpain 不会造成机体死亡。

第二章 钙激活蛋白酶系统的组成及其结构与特性

第一节 钙激活蛋白酶

一、钙激活蛋白酶的研究进展

Calpain 的研究始于 1964 年, 据德国 Dear 等 (1999) 报道, 哺乳动物中已有 8 个 calpain 通过鉴定, 而且他又报道了一个主要存在于动物睾丸中的 calpain, 所以目前报道的 Calpain 共有 15 个 (Dear 等, 1999)。关于 calpain, 目前研究较多的是 calpain-I (μ -calpain) 和 calpain-II (m-calpain), 其余 calpain 的研究进展不大。

Calpain 是一种钙激活中性半胱氨酸内肽酶 (EC 3.4.22.17), 分布于所有脊椎动物细胞中, 在果蝇属和寄生物细胞中也含有这种酶 (Croall 和 DeMartino, 1984, 1991; Saido 等, 1994)。另外, 在水生真菌 *Allomyces arbuscula* 中也发现了这种酶 (Ojha 等, 1988, 1991), 但在植物细胞中尚未提取得到 (Wolfe 等, 1989)。

近年来, 许多科学家对 calpain 的研究产生了浓厚的兴趣, 这主要是因为细胞内蛋白质的降解被认为是与细胞生长和萎缩密切相关的因素, 而细胞内大部分蛋白质的降解是由

非溶菌酶系统所引起的, calpain 就是此系统中的一个重要成员。

许多动物 μ -calpain 和 m-calpain 的 cDNA 已进行了克隆和测序, calpain 在活体中是如何发挥活性的, 其活性又是如何调节的仍不清楚。

二、钙激活蛋白酶的分布与结构

从表 2-1 (该表发表于 2001 年 calpains 研究国际会议, Montana, 2001-06-30 至 2001-07-05) 可以看出, calpain 1、calpain 2、calpain 5、calpain 7、calpain 10、calpain 12、calpain 14、calpain 15、calpain small subunit 1 和 calpastatin 分布于动物机体全身各组织器官中, calpain 3 分布于骨骼肌、晶状体和视网膜, calpain 6 可能分布于胎盘, calpain 8 分布于胃黏膜, calpain 9 分布于消化道, calpain 11 分布于睾丸, calpain 13 分布于睾丸和肺, calpain small subunit 1 分布情况不详。

表 2-1 哺乳动物中钙激活蛋白酶 (Calpain) 家族成员

Calpain 蛋白质 [#]	Calpain 基因	其他名称	EF- 手性序列	组织类别	物种	染色体 [#]	基因库编号 [#]
calpain 1	capn1	CAPN1	+	各类组织	人	11q13	X04366
					小鼠	19	NM_007600
					鼠	NA	NM_019152
calpain 2	capn2	m-calpain, CAPN2	+	各类组织	人	1	NM_001748
					小鼠	NA	NM_009794
					鼠	NA	NM_017116

钙激活蛋白酶与基础研究

续表

Calpain 蛋白质 [#]	Calpain 基因	其他名称	EF- 手性序列	组织类别	物种	染色体 [#]	基因库编号 [#]
calpain 3	capn3	nCL-1, p94, (Lp82, Lp85 Ri88)	+	骨骼、肌肉、 晶状体、 视网膜	人	15q15	X85030
					小鼠	2	NM_ 007601 AF091998
					鼠	NA	NM_ 017117 U96367
calpain 5	capn5	btra3 nCL-3	-	各类组织 (大多在结肠, 少量在 大肠、睾丸)	人	11q14	NM_ 014289
					小鼠	7	NM_ 007602
					鼠	NA	NA
calpain 6	capn6	CAPNX Calpamodulin	-	胎盘?	人	Xq23	NM_ 014289
					小鼠	X	NM_ 007603
					鼠	NA	AF067793
calpain 7	capn7	palBH	-	各类组织	人	3q24	AB028639
					小鼠	NA	NM_ 009796
					鼠	NA	NA
calpain 8	capn8	nCL-2	+	胃黏膜	人	NA	AA_ 043093
					小鼠	NA	NA
					鼠	NA	D14479-D14480
calpain 9	capn9	nCL-4	+	消化道	人	1	NM_ 006615
					小鼠	NA	U89513
					鼠	NA	U89514
calpain 10	capn10	CAPN10, CAPN8 *	-	各类组织	人	2q37	AF089088, AF089090-96
					小鼠	NA	NM_ 011796 AF089089
					鼠	NA	AF227909
calpain 11	capn11		+	睾丸	人	6q12	AJ242832
					小鼠	NA	NA
					鼠	NA	NA

第二章 钙激活蛋白酶系统的组成及其结构与特性

续表

Calpain 蛋白质 [#]	Calpain 基因	其他名称	EF- 手性序列	组织类别	物种	染色体 [#]	基因库编号 [#]
calpain 12	<i>capn12</i>	(Dear et al. unpublished)	+	各类组织 (毛囊中高量)	人	NA	NA
					小鼠	7	AJ289241
					鼠	NA	NA
calpain 13	<i>capn13</i>	(Dear et al. unpublished)	+	睾丸/肺	人	2q21-22	(AC068689) ^
calpain 14	<i>capn14</i>		-	各类组织	人	2q21-22	(AC015980) ^
calpain 15	<i>capn15</i>	Sol H	-	各类组织	人	16q13	U85647
					小鼠	17	NM015830
					鼠	NA	NA
calpain	<i>capn-s1</i>				人	19q13	NM_ 001749
smala	<i>or</i>	CAPN4	+	各类组织	小鼠	NA	NM_ 009795
subunit 1	<i>cpns1</i>				鼠	NA	RNU10861
calpain	<i>capn-s1</i>				人	16	AC026802
smala	<i>or</i>		+	无报道	小鼠	NA	AK009171
subunit 2	<i>cpns2</i>				鼠	NA	NA

注: * 建议名称

[#] 原有名称

^ 只有部分序列

NA = 无报道

Note: 无 calpain 4 存在

μ -calpain = 蛋白质二型异物体 calpain 1 蛋白质和一种小的亚单位

m-calpain = 蛋白质二型异物体 calpain 2 蛋白质和一种小的亚单位 (摘自于: <http://ag.arizon.edu/calpains/>)

目前研究较清楚的是 μ -calpain 和 m-calpain 的结构, 它们都由大、小两个亚基组成, 大亚基的分子量大约为 80kD, 小亚基的分子量大约为 30kD。不同来源的 calpain 其大亚基不同, 但小亚基相同 (DeMartino 1985; Kawasaki 1986)。

Calpain 大亚基由 4 个结构域组成。其中结构域Ⅱ作用最大，对其研究也最为深入，它约占大亚基总氨基酸残基的 35% 左右（氨基酸 77 ~ 316），是催化的主要部位，其活性中心由 Cys105、His262 和 Asn286 三个氨基酸残基组成，与巯基蛋白酶，如木瓜蛋白酶、组织蛋白酶有相似性（Metrione, 1986; Ohno 等, 1984）；结构域Ⅳ位于羧基端，占 20% 氨基酸残基（氨基酸 556 ~ 699），与其他钙结合蛋白如钙调素（CaM）、肌钙蛋白（Tropinin C）有明显的相似性，是钙离子的结合部位（Emori 等, 1986; Kretsinger 等, 1973; Minami 等, 1988; Ohno 等, 1984）；结构域Ⅲ占 35% 的氨基酸残基数（氨基酸 317 ~ 555），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 10% 的氨基酸残基数（氨基酸 1 ~ 76），与已知蛋白的序列都不相同，当 calpain 被激活后，结构域Ⅰ会发生自溶，因此推测其可能起活性调节作用（Imajoh 等, 1986a; 1986b; McClelland 等, 1989）。

小亚基由 266 个氨基酸组成，含有两个结构域，两个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Ⅴ富含甘氨酸（约 50% Gly），主要由疏水性氨基酸组成，它很可能与该酶的膜吸附特性有关。结构域Ⅳ' 与大亚基羧基端具有同源性，所以与钙调蛋白相类似（Garret 等, 1988; Imajoh 等, 1986b）（图 2-1）。各个亚基的具体情况如下：

- 结构域Ⅰ：

到目前为止，N-端区域与任何多肽序列没有同源性，在