

信号转导蛋白——磷脂酶 C- δ

白洁 罗深秋 冀群升

(第一军医大学细胞生物学与医学遗传学教研室 广州 510515)

磷脂酶 C- δ (phospholipase C- δ , PLC- δ)是磷脂酶 C 的 δ 型同工酶,与 PLC- β 和 γ 型一样,均为单链多肽分子,每型又有若干亚型。由于 PLC 能水解肌醇磷脂,产生肌醇三磷酸(inositol-1,4,5-trisphosphate, IP₃)和二酰甘油(diacylglycerol, DAG)。IP₃ 可作用于细胞内 IP₃ 敏感的 Ca²⁺ 库而致 Ca²⁺ 释放, Ca²⁺ 和 DAG 是公认的第二信使,这使 PLC 作为信号转导蛋白的地位得以确立。大量的资料表明 PLC- γ 参与有丝分裂及细胞生长信号传递,在细胞的生长、分化及恶性转化上起重要作用; PLC- β 主要

介导一些神经内分泌信号,在传递神经冲动、调节腺体分泌和细胞分化上发挥功能。而对 PLC- δ 的研究目前较多局限于酶的结构和活性调节方面,有关其引起的生物学效应的报道少见。本文对 PLC- δ 作一介绍。

一、PLC- δ 的蛋白质结构

现今为止, PLC 家族成员可分为三型,每型又有若干亚型,共 14 个,哺乳动物有 10 个,真菌、果蝇各两个。哺乳动物 PLC 大致结构如图 1 所示。

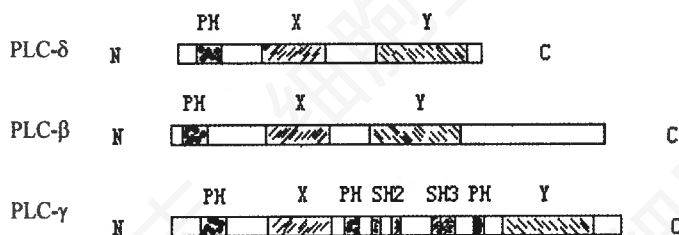


图 1 哺乳动物三型 PLC 结构简图

各型间分子大小、免疫反应均不相同,而且在所有的 PLC 成员中,除 X、Y 结构域外(分别由约 170 和 260 个氨基酸组成),其他部分的氨基酸序列同源性很低。其中,哺乳动物的 PLC- δ 分子量为 85KDa,有四个亚型: δ_1 、 δ_2 、 δ_3 和 δ_4 ,蛋白质结构仅由 N-端的一个血小板 C 激酶底物同源结构域(pleckstrin homology domain, pH)和完成催化功能所必需的两个结构域——X 和 Y 结构域组成。X 和 Y 结构域间的部分称为连接区,约 50 个氨基酸。PLC- δ_4 的三个剪接变异体 ALT I、II 和 III 由于 mRNA 剪接的原因,导致此区长短不同^[1]。从图 1 中可知,哺乳动物的 PLC- δ 较 β 型同工酶缺少长螺旋状的 C-端尾巴;较 γ 型不仅 C-端

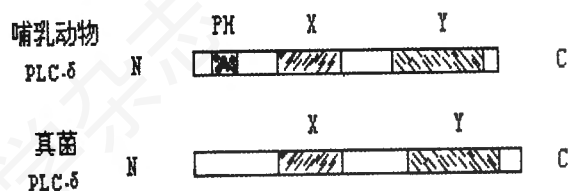


图 2 哺乳动物与真菌 PLC- δ 结构比较图

短,而且少了中间的 SH2 和 SH3 结构域(Src homology domain, SH 结构域);哺乳动物与真菌相比较, δ 型酶随进化而产生出 pH 结构域(图 2)。

可见在三型 PLC 中, δ 型结构最为简单和

本文为国家自然科学基金项目(39870381),广东省自然科学基金项目(980213)。

经济,这提示我们 β 和 γ 型可能是在 δ 型结构的基础上,在物种进化过程中,由于病毒的感受插入某些基因而产生的。可以说 PLC- δ 是 PLC 家族中最基本的成员。

二、PLC- δ 的生物活性

虽然 PLC- δ 结构最简单,却与 β 和 γ 型一样有完整的酶活性。从功能上看,PLC- δ 主要分两个区:X和Y结构域为酶催化区,pH结构域为底物结合区。

1. PLC- δ 催化区的功能

X和Y结构域的基本功能是水解肌醇磷脂,生成 IP_3 和DAG, IP_3 进一步使 Ca^{2+} 释放,胞内 Ca^{2+} 浓度升高。 Ca^{2+} 和DAG作为第二信使发挥作用。除此之外,在PLC- δ 催化区的活性位点中,Asn312、Glu341、Glu390和Asp343四个残基还参与 Ca^{2+} 结合,它们被取代将造成酶水解 PIP_2 时对 Ca^{2+} 浓度的需求增高。而His311和His356对水解作用十分重要,突变使酶活力分别下降大约20000和6000倍。Ser522、Lys438、Arg549和Lys440在酶对水解底物的选择上发挥作用,如Lys440被取代将影响对 PIP_2 的水解,对其他多聚肌醇磷脂无妨碍。这些资料表明PLC- δ 的催化区与 β 和 γ 型显著不同,不仅有催化作用还兼具底物识别和 Ca^{2+} 结合能力,是一多功能结构域。

2. PH结构域的功能

PH结构域存在于包括PLC- β 、 γ 和 δ 在内的100多种信号转导蛋白中,由约100氨基酸组成,是一类小的蛋白质组件,在结构简单的PLC- δ 中,它显得特别重要。PLC- δ PH结构域的最主要功能是高亲和力结合 $PI(4,5)P_2$ 和 $I(1,4,5)P_3$,指导其宿主蛋白与含肌醇磷脂的质膜结合。PH结构域内含丰富的碱性氨基酸——Arg和Lys,其中Lys30、Lys32、Arg37、Arg38、Arg40和Lys57空间结构上处于PH结构域表面,如将它们一一用中性或酸性氨基酸取代后,PH结构域与 $PI(4,5)P_2$ 和 $I(1,4,5)P_3$ 的结合、底物水解等功能会受到严重影响。

不同来源的PH结构域结合肌醇磷脂有一定的选择性,如Grp1的PH结构域倾向于结合 IP_4 ^[2],而PLC- δ 的则优先结合 PIP_2 和 IP_3 ,除此还可结合异三聚体的GTP结合蛋白的 $\beta\gamma$ 亚单位。通过绿色荧光蛋白标记发现:PIC- δ 及其独立的PH结构域均定位在膜上,胞质内也有存在,但数量显著低于膜结合的部分。PH结构域是PLC- δ 中唯一的肌醇磷脂结合位点^[3],它的突变使酶不能与质膜结合,只能存在于胞质中。这也证明了PH结构域是靠结合 PIP_2 和 IP_3 将宿主酶锚定于膜上的。

3. PLC- δ 的 Ca^{2+} 依赖性

对于PLC- δ 的信号途径目前了解极少,现有的资料仅给我们一轮廓。它的信号途径与 β 和 γ 不同,一般情况下,PLC- δ 与肌醇磷脂结合锚定于质膜上,当细胞受信号作用后,如渗透压降低,可使PLC- δ_1 从质膜迅速解离^[4],伴有 PIP_2 的水解,此现象受U73122的抑制。渗透压复原时又可观察到此酶重新结合于质膜上。但对PLC- δ 传导什么样的信号,有无受体介导,其间还有什么分子参与等均不清楚。

此信号传递途径必须依赖于 Ca^{2+} ,对 Ca^{2+} 的依赖性在PLC- δ 活性发挥及调节中是一个突出的特征。 Ca^{2+} 除了结合于催化中心外,在 C_2 区及EF臂上均有结合位点。结合位点虽多,但通常是以酶-单 Ca^{2+} -肌醇磷脂三元复合物的形式发挥作用。经X线分析发现这种三元复合物有几乎不变的结构模式^[5],即肌醇磷脂嵌合在pH结构域的活性位点中,在活性位点的底部与酶和催化中心结合的 Ca^{2+} 相互作用,在此过程中,活性位点的大部分残基不发生构象改变。不同的酶分子亚型对 Ca^{2+} 的依赖程度不同,PLC- δ_1 较 δ_3 对 Ca^{2+} 的需求要高,产生最大活性所需的 Ca^{2+} 浓度分别是10和 $1\mu\text{mol/L}$ 。PLC- δ 的活性受磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸和鞘磷脂的抑制,抑制作用也依赖 Ca^{2+} 。 Ca^{2+} 可启动抑制剂的抑制作用,并使酶对抑制的敏感性随 Ca^{2+} 浓度增

加而提高。缺少 Ca^{2+} 时,抑制剂对 PLC- δ 的活性无影响。

三、PLC- δ 引起的生物学效应

PLC- δ 的分布较广,含量由高到低依次为:骨骼肌、肺、心、肾、脑、肝、血小板等,在不同的器官和组织所引起的生物学效应也不同。

1. 参与细胞生长

参与细胞生长的是 PLC- δ_4 ,它主要存在于细胞核上。人们研究再生中的肝脏^[6],观察到 PLC- δ_4 mRNA 表达较正常静息期肝脏显著为高。生长迅速的细胞如肝癌细胞和 Src 转化的细胞中含量也十分丰富,而且血清可进一步地诱导其表达,可见 PLC- δ_4 对丝裂原刺激有反应。当细胞从 G1 到 S 期过渡时,核 PLC- δ_4 大幅增加,这种高含量的状态一直持续到 M 期结束。细胞再进入 G1 期时,PLC- δ_4 几乎消失,暗示 PLC- δ_4 参与细胞的生长。对 PLC- β_1 、 γ_1 和 δ_1 的检测表明这些酶不随细胞周期的进展发生明显变化。

另外发现,PLC- δ_4 的剪接变异体 ALT III 在体外可抑制 PLC- δ_4 ,而体内对所有型的 PLC 都可抑制。在大多数组织和细胞中,ALT III 表达水平极低,但独在神经细胞中相当高,它是否可通过抑制 PLC- δ_4 的活性来调节神经细胞的周期过程,使之处于暂不增殖状态? 这还是个谜。

2. 调节细胞的环境适应性

PLC- β_1 、 γ_1 和 δ_1 都在大鼠肾脏有表达, β_1 以内髓浓度最高,依次为外髓内带、皮质和外髓外带; γ_1 沿皮髓轴均匀地分布;只有 δ_1 从皮质到内髓含量逐渐增加,这与从皮质到内髓逐渐增加的组织渗透梯度相应。我们知道 PLC- δ_1 可受渗透压变化的刺激,在膜与胞质之间相互转位,并使 PIP₂ 水解。因此,PLC- δ_1 相应于渗透梯度的分布或许参与了肾脏髓质渗透调节的信号转导。另外人们在高等植物拟南芥中克隆到了一个 cDNA^[7],它编码 56 个氨基酸的多肽,分子量为 64Kda。含有在果蝇、真菌和哺乳动物 PLC 中都高保守的 X 和 Y 结构域,结构

与哺乳动物 PLC- δ 型最为相似,能水解 PIP₂ 且活性完全依赖于 Ca^{2+} 。正常状态时,它在植物中表达水平非常低,但在各种环境压力下如脱水、盐和低温等可被显著诱导。植物中这一例证也提示 PLC- δ_1 可能参与环境压力下的信号转导,调节细胞对压力的适应性。

3. PLC- δ 与某些病理状态

目前一些资料显示 PLC- δ_1 与 Alzheimer's 病^[8]和自发性高血压^[9]等有关。通过分析 Alzheimer's 病人的脑和非神经组织,发现在脑皮层和非神经组织的胞浆中,PLC- δ_1 水平显著增高,而水解活性却无变化,有的反而明显下降;在脑皮层细胞膜上,PLC- δ_1 的浓度显著降低,从而暗示低 PLC- δ_1 活性及其所导致的异常 PI 代谢与 Alzheimer's 病的发生有一定的联系。

在动物实验中,12 周龄的自发性高血压大鼠肾脏内髓、外髓内带中,PLC- δ_1 含量较正常血压的 Wistar-Kyoto 对照大鼠显著为低,甚至在高血压前期的 4 周龄,情况也是如此。这是否说明 PLC- δ_1 在高血压发展中起重要作用?

PLC 家族十分庞大,成员众多。从进化上看,PLC 参与信号转导非常早。三个亚型 PLC- β 、 γ 和 δ 源于一支,随物种进化而分离。PLC- δ 是其中最原始的一种,目前的研究并不是很多,对于其所介导的信号通路、涉及的分子事件、引起的生理效应及对疾病发生发展的影响都有待于人们的探讨。

摘 要

PLC- δ 是 PLC 家族中最基本的成员,能水解肌醇磷脂,产生肌醇三磷酸和二酰基甘油,参与信号转导。并与某些病理状态有关。

参 考 文 献

- [1] Nagano, K., et al., 1999, *J. Biol. Chem.*, **274**(5): 2872-2879.
- [2] Kavran, J. M., et al., 1998, *J. Biol. Chem.*, **273**(46):30497-30508.
- [3] Tall, E., et al., 1997, *Biochemistry*, **36**(23):7239-7248.

- [4] Fujii, M., et al., 1999, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **254**(2):284-291.
- [5] Essen, L. O., et al., 1997, *Biochemistry*, **36**(7):1704-1718.
- [6] Liu, N., et al., 1996, *J. Biol. Chem.*, **271**(1):355-360.
- [7] Hirayama, T., et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**(9):3903-3907.
- [8] Shimohama, S., et al., 1995, *Gerontology*, **41 Suppl. 1**:13-19.
- [9] Lee, K. H., et al., 1997, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **43**(4):741-747.

研究工作

猴 Fertilin β 氨基端 93 肽基因的克隆及其在大肠杆菌中表达*

王 健 沈卫英 刘 俊 高尔生 申庆祥**

(上海市计划生育科学研究所 上海 200032)

精子需通过其表面的黏附分子和卵母细胞表面黏附分子相互作用而穿过卵丘细胞层、透明带并最终与卵母细胞质膜结合并融合。Fertilin(原称 PH30)是由睾丸合成,在附睾中进行剪切加工的精子膜表面糖蛋白,是参与精卵质膜结合和融合的重要分子之一^[1]。它由 α (60 kDa)和 β (44 kDa)两个亚基构成异二聚体结构,两个亚基本身各自具有二硫键,但亚基间没有二硫键存在^[2]。其中 α 亚基含有一个由 22 个氨基酸组成的疏水肽段,与病毒的融合蛋白高度相似,在精卵的膜融合中起重要作用^[3]。成熟的 Fertilin β 亚基氨基端 93 肽区域,称作整联蛋白配体区(简称 F β NTP93),可通过与卵子膜表面整联蛋白的相互作用介导精卵的识别及结合^[4]。体外实验表明,Fertilin 的抗体对精卵融合具有剂量依赖性的强抑制作用^[5]。以提纯的 Fertilin 免疫雄性豚鼠,能导致完全不育;而免疫雌性豚鼠时,则引起部分不育^[6]。

目前已克隆到豚鼠、人及猴的 Fertilin cDNA^[4,5,7]。由演绎的氨基酸序列,对其中具融合功能的特异性肽段进行人工合成,进行精卵结合的竞争性抑制试验,初步证实该区域确实参与精卵细胞的结合和融合过程^[8-10]。但不同的研究者所用合成肽有效剂量相差 10 倍以上,出现这种现象的原因可能在于合成肽通常

只有六个或八个氨基酸残基组成,而这样小的多肽不具有空间结构,所以结果的可信度值得怀疑。有人用具备空间结构的 28 肽去作精卵结合的竞争性抑制试验,惊异地发现其对精卵结合与融合几乎没有什么影响^[9],但这不能说明 Fertilin β 整联蛋白配体区没有功能,因为该区富含半胱氨酸,分子间极易通过二硫键形成多聚体,影响了其功能的发挥。鉴于此,我们认为有必要制备抗 Fertilin β 整联蛋白配体区的抗体,研究其是否确实能阻断精卵细胞的结合和融合,从而更直接地证明该区域的功能,也为免疫避孕提供新途径。

我们采用 RT-PCR 技术,扩增获得编码 mF β NTP93 的 cDNA,克隆入含编码成熟人绒毛膜促性腺激素 β 亚基基因的表达式质粒 pT7-7/hCG β ,获得表达融合蛋白 mF β NTP93-hCG β 的表达式质粒,进而在大肠杆菌中表达这种融合蛋白,表达产物经纯化后将用于制备抗猴 Fertilin β -NTP93(mF β NTP93)抗体。由于融合蛋白中含有 hCG β ,不仅可以用抗 hCG β 抗体来检测融合蛋白的表达,还可以用抗 hCG β 抗体

本文 2000 年 6 月 8 日收到,11 月 22 日接受。

* CONRAD/Mellon Foundation 资助项目(MFG-93-23)。

** 联系人。