

- [22] Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., Helinski, D. R., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7347—7351.
- [23] Friedman, A. M., Long, S. R., Brown, S. E., Buikema, W. J., Ausubel, F. M., 1982, *Gene* 18:289—296.
- [24] Long, S. R., Buikema, W. J., Ausubel, F. M., 1982, *Nature*, (London). 298:485—488.
- [25] Downie, J. A., Ma, Q. S., Knight, C. D., Hombrecher, G., Johnston, A. W. B., 1983, *The EMBO Journal*. 2:947—952.
- [26] Ruvkun, G. B. and Ausubel, F. M., 1981, *Nature*, (London) 289:85—88.
- [27] Downie, J. A., Hombrecher, G., Ma, Q. S., Knight, C. D., Wells, B., Johnston, A. W. B., 1983, *Mol. Gen. Genet.* 190:359—365.
- [28] Schofield, P. R., Djordjevic, M. A., Folfe, B. G., Shine, J., Watson, J. M., 1983, *Mol. Gen. Genet* 192:459—465.
- [29] Sundaresan, V., Jones, J. D. G., Ow., D. W., Ausubel, F. M., 1983., *Nature* (London) 301:728—732.

钙调蛋白的分布

祖父江宪治

钙调蛋白(Calmodulin, 简写 CaM), 自从作为磷酸二酯酶的 Ca^{2+} 依赖性激活蛋白, 被发现以来, 现在已清楚 CaM 还是各种 Ca^{2+} 依赖性酶系的激活因子。据报道, 在哺乳动物的各种组织以及蛙卵、章鱼、海胆卵、蚯蚓、扇贝、海葵、海藻、藻类、霉菌、粘菌、四膜虫、大麦、人参、大豆、菠菜中都分离到了 CaM 或类 CaM 蛋白。显然 CaM 的广泛分布和作用是其特有的多功能性分不开的。然而各种 CaM 的氨基酸组成很相似, 氨基酸顺序也只是在种属上有点差异。大多数 CaM 有一个三甲赖氨酸残基, 没有胱氨酸残基, 这些正是同肌钙蛋白 C 的区别之一。本文想通过分析 CaM 的存在方式来综述 CaM 的分布, 特别是细胞内分布。

研究 CaM 分布必须解决如何定量的问题。现在一般采用二种方法, 即酶学方法(以激活磷酸二酯酶等 CaM 依赖性酶的能力进行定量的方法)和用 CaM 抗体的免疫学方法。我们建立的酶学定量法能对上清液和沉淀中 CaM 进行定量(以往的酶法只能测定上清液部分), 对象是组织中完整的 CaM。免疫学方法最近也被用来定量, 但还不能进行系统的组织分布测定。因此, 以下阐述组织分布以酶学方法为主, 细胞内分布以免疫学方法为主。

哺乳动物 CaM 的组织分布特点是脑、肾上腺和脑下垂体等分泌性组织中较多。CaM 在脑部的分布是大脑和小脑皮质以及下丘脑多, 在白质中少。有报道说, 这些分泌性组织的分泌机理中有肌动蛋白和微管蛋白等细胞骨架蛋白参与, CaM 是通过其结合蛋白来调节细胞骨架的机能。这有助于理解 CaM 在上述组织

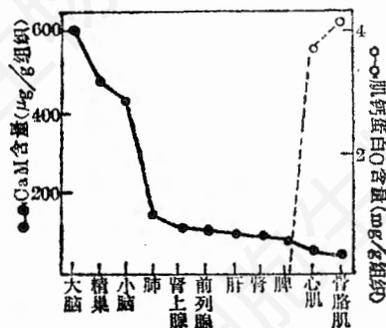


图 1 CaM 和肌钙蛋白 C 的组织分布比较

中的功能。精巢中的 CaM 含量同脑中的含量相近, 但 CaM 依赖性酶只有磷酸二酯酶一种, 量也很少。因此, 精巢中 CaM 量为什么这样多还是个谜。骨骼肌的 CaM 含量最少。

组织分布中引人注目的是 CaM 和肌钙蛋白 C 的分布不同(图 1), 脑和精巢 CaM 含量最高, 心肌和骨骼肌最低。肌钙蛋白 C 集中在 CaM 含量最少的心肌和骨骼肌中, 其他组织中尚无报道。在非肌肉组织的复杂的 Ca^{2+} 调节机制中, 多功能的 CaM 起主要作用, 但到了肌肉中功能则局限于收缩蛋白的 Ca^{2+} 调节和能量产生系统, 在收缩系统中 CaM 更为专一化, 变成只有单一功能的肌钙蛋白 C, 在能量产生系统中 CaM 参与 Ca^{2+} 调节, 从某种意义上说, 这是一种合乎组织要求的进化。

现在知道将动物组织放在含螯合剂的缓冲液中匀浆, 然后以 $105,000 \times g$ 离心 1 小时, CaM 会分布于

上清液和沉淀两相中,但CaM分布随结合形式的不同而发生变化。

(1) CaM仅存在于细胞质可溶性组分中,通过Ca²⁺的有无与这一组分中的酶或其他蛋白质结合或是解离。大多数CaM依赖性酶属于这种类型(图2)。

(2) 细胞质中的CaM通过Ca²⁺依赖性地与膜上面的酶或蛋白结合或解离,在细胞质和膜之间移行。腺苷酸环化酶、红血球和突触膜的Ca²⁺、Mg²⁺ ATP酶、磷脂酶A₂等CaM结合蛋白都是CaM的结合部位。

(3) 细胞质中的CaM与细胞内的结构成分,特别是肌动蛋白和微管蛋白等细胞骨架蛋白中的结合蛋白相互作用。这种类型随着CaM的结合或解离,能使细胞骨架结构产生很大的变化。最近作者等提出的触发(flip-flop)型的调控机制就属这一类型(图3),在Ca²⁺存在下,CaM和结合蛋白形成复合体后就离开细胞骨架;在无Ca²⁺情况下,结合蛋白则同细胞骨架结合。在小鸡砂囊平滑肌的肌动蛋白系中,CaM受体(Caldesmon)和肌球蛋白轻链激酶是CaM结合蛋白,形成肌动蛋白、肌球蛋白或细丝之间的Ca²⁺调控系统。在脑的微管蛋白系中,促进微管蛋白聚合的tau因子就是CaM结合蛋白。在通过触发器的微管蛋白聚合或解聚中,CaM和tau因子均具有Ca²⁺敏感性。

(4) CaM作为组成单元以整合状态存在于巨大蛋



图3 依赖CaM、CaM结合蛋白的触发型调控机制

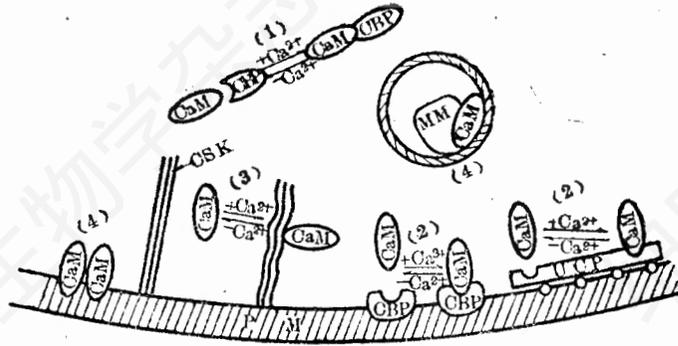


图2 CaM在细胞内的存在方式(说明在文中)

CaM: 钙调蛋白, CBP: 包括酶的CaM结合蛋白, CSK: 细胞骨架蛋白(肌动蛋白和微管蛋白), MM: 巨大蛋白, VCP: 附在细胞膜上的外来蛋白, PM: 细胞膜。

白分子或细胞内结构成分中,仅仅消除Ca²⁺不能使之解离。这种存在形式的典型见之于磷酸化酶b激酶中。这种酶由α、β、γ、δ四种亚单位组成,其中δ亚单位就是CaM。

以大脑皮质为例,沉淀中的CaM占全部CaM的27%;在肾和脾的组织中所占的比例高达40~60%。这些数据说明,沉淀中的CaM起着重要的作用。因此,有人对脑的膜组分(以突触膜和微粒体膜为主)进行了分离提纯,先用TritonX-100使97%的CaM溶解出来,接着上DEAE-纤维素和氟奋乃静(CaM拮抗剂)亲和层析柱提纯。按分子量,生物活性,Ca²⁺有无对结构的影响和Ca²⁺敏感性等四条标准进行鉴定,发现所得蛋白质同血清液中的完全一样。另外,根据TritonX-100可使CaM溶解出来的事实,推想它是以整合在膜脂质中的所谓内在性(intrinsic)形成存在。Watterson等在性状转换和细胞增殖过程中都注意到了CaM增加的现象。另一方面在用实验肝癌(Morris hepatoma)的实验中,发现CaM总含量没有变化,仅随细胞增殖其在上清液和沉淀两相中的分布发生改变(表1)。增殖速度越快,上清液中的CaM越多。在正常肝中CaM在沉淀里的比例高,上清液里要低一些。

表1 实验肝癌组织的CaM浓度

组 织	μgCaM/g组织			上 清 液 沉 淀	μgCaM/mg 蛋白	
	上清液中	沉淀中	合 计		上清液中	沉淀中
正 常 肝	46.7±0.8	57.7±3.8	104.4±4.1	0.81	0.567±0.07	0.927±0.073
9633	63.3±1.7	29.9±0.1	93.2±1.7	2.11	0.740±0.033	0.631±0.017
3924 A	120.5±3.9	12.3±0.5	132.8±4.1	9.83	2.63 ±0.10	0.709±0.012

注: 3924 A是增殖极快的肝癌。9633是迟缓肝癌。

Evain 等报道培养的中国田鼠卵巢细胞(CHO 细胞), 上清液中的 CaM 随着细胞密度增加而增加, 沉淀中的则相应减少。根据他们的实验, 说明 CaM 的分布与细胞增殖和细胞间的接触抑制有关。

1978 年, Dedman 用不加任何化学修饰的大鼠睾丸 CaM 免疫山羊, 成功地制备了抗体。次年 Wallace 等报道, 用 1-氟-2,4-二硝基苯(DNB)作用半抗原牛脑 CaM, 使之 DNB 化, 从免疫的兔中得到了抗体。最近, Wallace 等推荐更易推广的用经甲酸处理的抗原来制备 CaM 抗体。虽然很难确定用各种不同免疫方法得到的抗体是否相同, 许多研究室都报道了用各自抗原建立的放射免疫定量法但实验应用的例子少得出奇, 因此可以说几乎没有。CaM 组织分布的系统结果。唯一的能反映细胞内分布的例子是小脑细胞组分内 CaM 的定量(表 2)。

表 2 大鼠小脑中的 CaM 分布

	CaM含量($\mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白)
小脑	9.5
核	6.7
线粒体	4.4
微粒体	19.3
细胞膜	11.0
突触上清液	13.4
多核糖体	3.6
神经微管蛋白	<0.002
突触膜	10.6
突触后膜致密处	30.8

表 3 粗微粒体组分中的 CaM 含量

组 分	CaM($\mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白)	
	Linden等的结果	Sobue等的结果
粗微粒体组分	97.7	0.59
粗被膜小泡组分	73.3	
纯化被膜小泡	1.6	

注: 组分都用含螯合剂(EGTA)的缓冲液提纯。

一般用放射免疫测定法所得的 CaM 定量值要比酶法所得的高出 2~200 倍(表 3)。按 Linden 等的方法, 粗微粒体组分中得到的定量值是 $97.7 \mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白, 粗被膜小泡组分中是 $73.3 \mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白, 分别占各自组分总蛋白量的 98% 和 73%。作者等制备的微粒体 CaM (沉淀中的 CaM) 纯化后的测定值为 $0.59 \mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白, 与上述数值相差 166 倍。尽管提纯微粒体 CaM 的方法

不一样, 这个差别还是太大了。当前必须解决的是放射免疫测定法中的抗体专一性问题。酶法也同样要解决专一性的问题。

将 CaM 抗体应用于免疫组织学的定位工作已有报道。在脑中抗体染色只局限在神经元, 其特点是突触部位中突触后膜细胞质一侧染色明显, 在突触前膜和小泡中反应弱。从细胞质总体看反应很弱。在小脑浦肯野氏细胞和颗粒细胞中 CaM 局限于核糖体、粗糙型面内质网、光滑型内质网和核周围部分, 但在粗面内质网腔和高尔基体中没有反应。在神经轴索部位, 已证明滑面内质网、小泡以及线粒体中有 CaM 存在。

在大鼠肝中, 细胞质、核和细胞膜同 CaM 抗体有染色反应, 特别是已证明细胞质中 CaM 的分布同糖原颗粒的分布相一致。这也许是因为同参与糖原代谢的酶有关。磷酸化酶 b 激酶是一种糖原代谢酶, 其存在方式属于上述(4)型。此外还有糖原合成酶激酶, 这也是 CaM 依赖性酶, 同 CaM 的结合形式是 Ca^{2+} 依赖性结合, 其存在方式应属(1)型, 但因其分布局限于原糖颗粒内, 还是考虑为(4)型较好。

在肌肉中, 有的同肌内质网、细胞膜和线粒体起反应, 有的同 I 带有反应, 因为 I 带中有糖原颗粒和肌内质网。有报道认为在肌内质网中 CaM 起调节 Ca^{2+} 泵的作用, 推测其与红血球膜的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATP 酶类似, 应属于(2)型。在肾上腺皮质中, 从细胞质到核广泛地与 CaM 抗体起反应。以地塞米松处理大鼠, 可增强肾上腺皮质细胞核中的反应, 如经 ACTH 处理, 则变化更明显。提示 CaM 可能是依赖 ACTH 的 RNA 合成的调节因子。但也有报道否定核中的 CaM 抗体反应, 这是否因使用的抗体不同所致, 有待今后作进一步的研究。

细胞核中另一个受人注目的问题是依赖 CaM 的 DNA 合成。Boynton 等选用大鼠肝 T 518 细胞, 看到了在 DNA 合成中细胞外液必须要有 Ca^{2+} 存在的现象, 探讨了由 Ca^{2+} 产生的 DNA 合成开始的指令是通过 Ca^{2+} -CaM 来实现的可能性。有报道说, CaM 抑制剂氯丙嗪和三氟吡啶嗪可抑制依赖 Ca^{2+} 的 DNA 合成的开始, 但添加 CaM 可恢复。在用无伤细胞的实验中, 疑问不少, 有待于今后进一步的研究。

在线粒体中, 已用抗体法确定了 CaM 的分布。Pardue 等又设计了用罗丹明染料标记的 CaM(CaM-RITC)来检测细胞内结合部位的方法, 也得到同样的结果。他们报道, 若在福尔马林处理过的培养的纤维母细胞中加入 CaM-RITC, 可发现线粒体首先而且是

Ca^{2+} 依赖性地被罗丹明染料着色,提示线粒体中存在 CaM 结合蛋白。然后将线粒体可溶性蛋白上 CaM 亲和层析柱,最后可分离出依赖 Ca^{2+} 结合上的 120,000 和 67,000 道尔顿为主的蛋白质,以及 100,000、60,000 和 40,000 道尔顿的蛋白质。这些是否都是 CaM 结合蛋白还不清楚,但有意义的是显示了线粒体可能有新的功能。这种 CaM 存在方式是(2)型。细胞膜上的阳性反应有(2)型和(4)型。b型包括所有膜结合性的 Ca^{2+} 和 CaM 依赖酶。此外也还有膜的 CaM 结合蛋白。哺乳动物所有组织都有 CaM 结合蛋白存在,其中以脑和肾上腺中最多,在脑中的,突触部位也不少。作者等在此结合部位分离出并提纯 240,000 和 155,000 道尔顿的蛋白质。这一结果和突触部位特别是突触后膜部的 CaM 分布很一致。用 CaM 抗体染色兔或土拨鼠精子时,在未显示顶体反应(acrosome reaction)的精子中,除了顶体外,头部后方、鞭毛的基部和端部也都能着色。随着顶体反应的进行,顶体中的 CaM 消失, CaM 从精子头部转移到游离的膜部分中去。但未发现在其他部位 CaM 分布的变化。这提示精子获能时的 Ca^{2+} 调节机制与 CaM 有关。把精子分成头部和尾部,然后用酶法定量也取得同样的结果。

在培养细胞的实验中,细胞骨架蛋白和 CaM 的关系(3型),据 Dedman 等报道,在 3T3 细胞或成纤维细胞等以肌动蛋白为主要成分的细胞中,可看到沿张力纤维有荧光抗体反应的现象。像 HeLa 细胞那样张力纤维不明显的细胞,细胞质荧光呈弱的弥漫性分布。但是两者都没有显示出在核内的分布,这同 Harper 等的结果不一致。Welsh 等和 Anderson 等都显示 CaM 特异性地分布于细胞分裂中的有丝分裂器上,并注意到 CaM 可能同参与细胞分裂的微管蛋白有联系。用 3T3 细胞的实验结果表明:细胞分裂前期, CaM 在染色体周围和细胞质中呈弥漫性分布,进入前中期开始变为沿纺锤体分布。在中期和后期转到纺锤体和中心粒上,并慢慢向两极移动。在末期只分布于两极,而且分裂沟也无免疫荧光反应。但分裂沟能与肌动蛋白抗体起反应,所以这时期的肌动蛋白至少在分裂沟中与 CaM 没有直接的关系。

用各种抑制剂的实验也证实了这一点。用肌动蛋白抑制剂细胞松弛素 B 处理, CaM 分布没有变化,用微管蛋白抑制剂秋水仙胺处理,则引起分布的变化。

有丝分裂器主要由微管构成,1972年 Weisenberg 报道体外微管重建获得成功,这重建系由 μM 量级的 Ca^{2+} 控制聚合和解聚,人们才开始注意微管中的 Ca^{2+} 感受性因子。Marcum 等根据提纯的微管中若添加 CaM 就会出现 Ca^{2+} 敏感性的现象,提出这一因子就是 CaM。Kumagai 等报道 CaM 和微管蛋白(二聚物) 1:1 结合能控制微管蛋白的聚合和解聚。另外,作者等在鉴定 CaM 结合蛋白的研究中也发现,微管聚合促进因子(微管结合蛋白)之一的 tau 因子就是 CaM 结合蛋白,并弄清了就是图 3 的触发机理调控着微管蛋白的聚合或解聚。

免疫组织化学的结果同 Kumagai 等以及作者等的结果未必一致,然而两者在提示 CaM 和微管蛋白有联系这一点上则是相同的。在生化鉴定中微管蛋白或 tau 因子同 CaM 结合有解聚意义,但很难考察微管周围的 CaM 抗体反应性。不管怎样,微管周围有 CaM 的可能性是存在的,从免疫组织化学鉴定结果看也是如此,不过问题不少,固定方法和包括 Ca^{2+} 在内的固定条件等都是今后需要研究的课题。

Schliwa 等用经表面活性剂处理的猴 BSC-1 培养细胞的细胞骨架作材料,观察到添加 Ca^{2+} 所造成的微管解聚可被 CaM 抑制剂所抑制。CaM 同肌动蛋白的关系,根据细胞分裂时 CaM 抗体分布与肌动蛋白分布的不一致,是否定的。但把静止期张力纤维周围的 CaM 抗体反应以及 CaM 通过小肠微绒毛中心部 110K 蛋白(Ca^{2+} 非依赖性 CaM 结合蛋白)同微丝(以肌动蛋白为主)结合的事实放在一起考虑,那么仅用免疫组织化学方法对比还不能下结论。CaM 通过 CaM 受体或肌球蛋白轻链激酶等 CaM 结合蛋白同肌动蛋白的间接联系已经证明,但是否由图 4 的触发型机理调控,目前的免疫组织化学的方法还不能肯定。

综上所述,有必要依据 CaM 的存在方式,动态地掌握 CaM 的分布。从 CaM 定量法到 CaM 分布检测,无论是生化方法还是免疫学检测方法都还有问题,只从一个侧面是弄不清楚的。有待今后以新的方法从多方面进行研究。

上海市计划生育科学研究所

徐万祥 译 编辑部 校审

[蛋白质·核酸·酵素 1982, 27, 2201~2210,]