

龙虾 D-甘油醛-3-磷酸脱氢酶与辅酶类似物结合的晶体学

沈月全 王兆捷 宋时英 周筠梅 林政炯*

(中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室, 北京 100101. *联系人, Email: lin@sun5.ibp.ac.cn)

摘要 与辅酶不同, 辅酶类似物 ADP-ribose 和 SNAD 与 D-甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的结合不表现协同性. 用共晶方法和座滴汽相扩散技术培养出中国南海龙虾(*Palinurus versicolor*) GAPDH 与 ADP-ribose 和 SNAD 复合物的晶体. X 射线衍射数据分析表明它们的空间群均为 $C2_2$, 并具有类似晶胞参数, 分别为 $a = 15.280$ nm, $b = 10.035$ nm, $c = 12.831$ nm, $\beta = 110.28^\circ$ 和 $a = 15.341$ nm, $b = 10.051$ nm, $c = 12.844$ nm, $\beta = 110.48^\circ$. 估算不对称单位含 1 个分子即 4 个亚基. 与 GAPDH 全酶和酶蛋白晶体比较, 属于不同晶型. 这个结果提示着辅酶类似物的结合产生了比较大的酶构象变化, 而且这个构象变化不同于辅酶结合引起的构象变化. 旋转函数计算结果表明, 这两种辅酶类似物复合物的四聚体也具有明显的 222 分子对称性. 它们的结构分析与全酶和酶蛋白比较将了解酶的协同性机理提供一些有益的线索.

关键词 D-甘油醛-3-磷酸脱氢酶 ADP-ribose SNAD 晶体培养 X 射线分析

D-甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH; EC1.2.1.12) 由 4 个化学上等价的亚基组成, 分子量约为 145 ku. 它是生物体内葡萄糖酵解过程中的一个关键酶, 在有 NAD^+ 和无机磷酸存在的条件下, 它能催化 D-甘油醛-3-磷酸氧化磷酸化成 1,3-二磷酸甘油酸. 最令人感兴趣的是 GAPDH 与 NAD^+ 结合的协同性现象和与某些烷基化或酰基化试剂反应时表现出的半位反应性质^[1]. 对协同性机制的解释主要有两个模型, 即配基诱导序变模型和预存不对称模型. 酶蛋白(apo-GAPDH) 与全酶(holo-GAPDH)高精度结构显示 GAPDH 的 4 个亚基呈良好的 222 对称性^[2~5], 并且 NAD^+ 与 GAPDH 结合过程中引起了构象变化^[6], 倾向于支持配基诱导序变模型. 但是这些构象变化是否与协同性紧密相关? 亚基间构象变化又是如何传递的? 这些问题还不清楚.

NAD^+ 类似物与 GAPDH 结合的生物化学实验研究已为了解协同性机制提供了重要的信息^[7,8], 但有关三维结构信息的不足限制了对协同性机制的深入了解. ADP-ribose 是 NAD^+ 的竞争性抑制剂, 具有很强的抑制能力; SNAD 可以代替 NAD^+ 发挥辅酶的作用, 而且它与 GAPDH 复合物具有很小的解离常数^[7]. 因此, 选择这两个辅酶类似物进行结构研究可以确保辅酶类似物与 GAPDH 的充分结合. 更重要的是, 与 NAD^+ 相反, ADP-ribose 和 SNAD 与 GAPDH 的结合不表现协同性. 这样, 它们与 GAPDH 结合的复合物(简称为 ADR-GAPDH 和 SNAD-GAPDH) 结构测定并与具有协同性的 NAD^+ 与 GAPDH 复合物(全酶)的结构比较, 找出这两个辅酶类似物与 GAPDH 结合引起的构象变化与 NAD^+ 诱导的构象变化之间的区别, 可能会给解释负协同作用机制带来新的启示.

1 方法与结果

1.1 分离、纯化和结晶

Holo-GAPDH 酶从中国南海龙虾尾肌中提取, 分离纯化方法参考文献^[9], 用硫酸铵分级

沉淀法进行提纯, 共进行 6 次重结晶. 所得酶制品用聚丙烯酰胺凝胶电泳检查为一条带, 比活力约为每毫克蛋白 150~180 单位. 然后将纯酶悬浮于 76% 的硫酸铵溶液中, 在 4℃ 冰箱中保存. Apo-GAPDH 的制备参考文献[10], 用活性炭来吸附 NAD^+ , 最后得到的酶比活力与全酶近似, $A_{280}/A_{260} = 1.8\sim 2.0$. 将 apo-GAPDH 的晶体放置在含 0.2 mmol/L ADP-ribose 或 SNAD 的晶体生长溶液中浸泡, 24 h 以后就可以观察到晶体发生了破裂现象. 此结果表明这两个辅酶类似物与 GAPDH 确有很强的结合能力.

采用共晶法和座滴汽相扩散技术培养 ADR-GAPDH 和 SNAD-GAPDH 晶体, 内液体积为 20 μL , 含 5 mg/mL apo-GAPDH, 1.0 mmol/L EDTA, 1.6 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.75 mmol/L ADP-ribose 或 2.0 mmol/L SNAD, 0.1 mol/L KH_2PO_4 , K_2HPO_4 (pH=6.2). 外液体积为 6 mL, 含 2.7 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2 mol/L KH_2PO_4 , K_2HPO_4 (pH = 6.2). 放置在 18℃ 恒温箱内, 4 d 左右出现晶体, 两周后生长成可供 X 射线衍射用的晶体 (图 1). 在晶体生长过程中, 经常出现单晶与规则孪晶并存的现象. 因此在选择晶体进行 X 射线衍射时, 必须用高倍显微镜进行仔细核查以确保晶体的单晶性. 对于 ADR-GAPDH, 采用悬滴气相扩散法还获得了另一种晶体, 条件为 0.1 mol/L HEPES 缓冲液 (pH = 7.5), 20% PEG4000 及 10% 异丙醇作沉淀剂, 蛋白浓度为 10 mg/mL. 此条件下晶体外形为棒状, 但衍射能力很差, 没有作进一步的分析.



图 1 GAPDH 与 ADP-ribose 复合物的晶体

1.2 X 射线分析

用 Mar Research Image Plate 345 来收集 X 射线数据, 温度为 18℃, $\text{CuK}\alpha$ 辐射, 晶体中心与探测器距离为 200 mm, 每个画面的曝光时间为 10 min, 回摆角为 数据收集范围为 $0^\circ \sim 180^\circ$. ADR-GAPDH 的衍射分辨率达到 0.30 nm, 而 SNAD-GAPDH 的为 0.28 nm, 数据处理用程序 Denzo, 合并程序用 Scalepack^[11]. 数据处理与分析表明两种晶体空间群都为 C2. 估算不对称单位含 1 个分子即 4 个亚基^[12], 溶剂含量约为 55%. 具体的晶体学参数见表 1.

表 1 两个 GAPDH 复合物的晶体学参数^{a)}

	ADR-GAPDH	SNAD-GAPDH
空间群	C2	C2
晶胞参数	$a = 15.280 \text{ nm}$	$a = 15.341 \text{ nm}$
	$b = 10.035 \text{ nm}$	$b = 10.051 \text{ nm}$
	$c = 12.831 \text{ nm}$	$c = 12.844 \text{ nm}$
	$\beta = 110.28^\circ$	$\beta = 110.48^\circ$
不对称单位分子数	1	1
观察点数	92 755	119 278
独立反射点数	35 188	44 055
总完整度/%	97.2	98.0
最外壳层完整度/%	98.5	97.9
分辨率/nm	0.30	0.28
合并 R 因子/%	13.8	12.6
最外壳层合并 R 因子/%	35.0	37.9

a) apo-GAPDH 晶体空间群为 C2; 晶胞参数为 $a = 12.86 \text{ nm}$, $b = 9.98 \text{ nm}$, $c = 8.08 \text{ nm}$, $\beta = 114.8^\circ$ ^[13]; holo-GAPDH 与其同晶

用 CCP4 程序包^[14]中的 PLOARRFN 程序作自身旋转函数分析. 旋转函数的独立区为: $0 \leq a \leq \pi$, $0 \leq b \leq \pi$, $0 \leq g \leq \pi$. 共计算了 1.2~0.5 nm 和 0.8~0.5 nm 两种分辨率区间. 积分半径为 3.0 nm, 角度间隔为 5° . 两种分辨率区间的计算结果相似. 表 2 给出了 SNAD-GAPDH 0.8~0.5 nm 分辨率区间的计算结果(ADR-GAPDH 的结果基本一样, 没在表中列出). 自身旋转函数结果均表明存在两个突出的峰, 即表 2 中峰 II 和 III, 由相应的球极坐标 $c=180^\circ$ 可知它们对应于两个非晶体学二重轴, 并由 w 值相差 90° 可以判断这两个非晶体学二重轴彼此垂直, $j=0^\circ$ 则表示它们位于 ac 平面内. 峰 I 与晶体学二重对称有关, 即原点峰, 此二重轴显然与上述两个非晶体学二重轴互相垂直. 从这些结果可以推断, ADR-GAPDH 和 SNAD-GAPDH 的四聚体也具有明显的 222 分子对称性, 而且分子轴 P, Q, R ^[15] 在晶体中的方向与这 3 个轴平行 (共有 3 种可能组合方式). 分子置换法结构测定尚在进行中.

表 2 SNAD-GAPDH 的自身旋转函数结果^{a)}

峰号	I			II			III		
峰的位置	q_1	q_2	q_3	q_1	q_2	q_3	q_1	q_2	q_3
欧拉角/ $^\circ$	0	180	0	0	131	180	180	49	0
	w	j	c	w	j	c	w	j	c
极角/ $^\circ$	90	90	180	65	0	180	155	0	180
峰的高度	100			71.2			71.2		

a) 分辨率范围为 0.8~0.5 nm; 最大背景峰的高度为 28.9; w 为与极轴的夹角, j 为沿着赤道平面旋转的角度

2 讨论

中国南海龙虾甘油醛-3-磷酸脱氢酶与 ADP-ribose 或 SNAD 的复合物晶体生长条件和结构已知的同一种属酶蛋白和全酶基本相似, 都是以硫酸铵作沉淀剂, 但是长出不同晶型 (空间群都是 $C2$, 但是晶胞参数明显不同, 见表 1). ADR-GAPDH 或 SNAD-GAPDH 晶型 ($C2(II)$) 比 apo-和 holo-GAPDH 晶型 ($C2(I)$) 扩大了整整 1 倍. 由于 $C2(II)$ 型的晶胞比较大, 3 个轴的线度都超过了 10 nm, 不对称单位的非氢蛋白原子数达到了 10 024 个, 这就影响了晶体的衍射能力, 用常规 X 射线仪器只能得到中等分辨率数据. 用更强的 X 射线光源, 例如同步辐射光源, 将能进一步提高晶体衍射数据的分辨率和质量.

Bacillus stearothermophilus 与 *Palinurus versicolor* GAPDH 的结构研究表明, 辅酶结合前后酶构象有较大的变化, 主要反映在两个结构域之间有相对运动^[6]. 与 NAD^+ 分子相比, ADP-ribose 只少了尼克酰胺部分, SNAD 只有尼克酰胺中的氧原子被硫原子替代, 然而与 NAD^+ 不同, 它们与 GAPDH 结合都无协同性. ADP-ribose 或 SNAD 与 apo-GAPDH 晶体结合会引起晶体破裂表明这两个辅酶类似物结合于 GAPDH 可能会发生某种构象变化. ADR-GAPDH 和 SNAD-GAPDH 的晶胞完全不同于 apo-和 holo-GAPDH 则暗示着这两个辅酶类似物所引起的 GAPDH 构象变化可能与 NAD^+ 结合所导致的构象变化不相同. 这两个复合物结构本身良好的同晶性则显示 ADP-ribose 和 SNAD 分子结合所导致的构象变化存在着许多相同的地方. 这种构象变化差别与相似可能是了解负协同性机理的关键所在. 这两个复合物的详细结构分析和比较应该能提供有用的线索来了解 GAPDH 结合 NAD^+ 的负协同性现象.

致谢 本项研究是在邹承鲁教授的关心和指导下进行的. 本工作为国家自然科学基金资助项目(批准号: 39570169).

参 考 文 献

- 1 Levitzki A. Half-of-the-sites and all-of-the-sites reactivity in rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Mol Biol*, 1974, 90: 451 ~ 458
- 2 Song S Y, Li J, Lin Z J. Structure of holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Palinurus versicolor* refined at 2.0 resolution. *Acta Cryst*, 1998, D54: 558 ~ 569
- 3 Skarzynski T, Moody P C E, Wonacott A J. Structure of holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.8Å resolution. *J Mol Biol*, 1987, 193: 171 ~ 187
- 4 Korndorfer I, Steipe B, Huber R, et al. The crystal structure of holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyper-thermophilic bacterium *Thermotoga maritime*. *J Mol Biol*, 1995, 246: 511 ~ 521
- 5 Emile D, Olivier-Deyris L, Fanchon E, et al. Comparison of the structures of wild-type and a N313T mutant of *Escherichia coli* glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase: implication for NAD binding and cooperativity. *J Mol Biol*, 1996, 257: 814 ~ 833
- 6 Skarzynski T, Wonacott A J. Coenzyme-induced conformational changes in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *J Mol Biol*, 1988, 203: 1097 ~ 1118
- 7 Denise E, Kirtley M E. Interaction of nicotinamide-adenine dinucleotide and its analogs with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, 1971, 10: 2677 ~ 2682
- 8 Denise E, Kirtley M E. Cooperativity and noncooperativity in the binding of NAD analogues to rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, 1976, 15: 2168 ~ 2171
- 9 Allison W S, Kaplan N O. The comparative enzymology of triosephosphate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 1964, 239(7): 2140 ~ 2152
- 10 何燕生, 练永宁, 姜淑仙, 等. 羧甲基甘油醛-3-磷酸脱氢酶光照产生新荧光物质的研究. *中国科学*, 1979, (3): 303 ~ 316
- 11 Otwinowski Z, Minor W. Processing X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol*, 1997, 276: 307 ~ 326
- 12 Matthew B W. Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol*, 1968, 33: 491 ~ 497
- 13 宋时英, 高义贵, 谢贵福, 等. *Palinurus Versicolor* 龙虾肌肉 D-甘油醛-3-磷酸脱氢酶与辅酶结合的初步晶体学研究. *中国科学, B 辑*, 1988, (2): 139 ~ 143
- 14 Collaborative computational project, number 4. The CCP4 suite: program for protein crystallography. *Acta Cryst*, 1994, D50: 760
- 15 Buehner M, Ford G C, Moras D, et al. Three-dimensional structure of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. *J Mol Biol*, 1974, 90: 25 ~ 49

(1999-08-13 收稿, 1999-11-10 收修改稿)