

龙虾 D-甘油醛-3-磷酸脱氢酶四方晶型结构^{*}沈月全 宋时英 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)

摘要 用座滴汽相扩散法培养出龙虾 (*Palinurus versicolor*) D-甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (holo-GAPDH) 的四方型晶体, 空间群为 $P4_21_2$, 晶胞参数为 $a = 15.49 \text{ nm}$, $c = 8.03 \text{ nm}$, 不对称单位含两个亚基. 应用分子置换法测定了 0.34 nm 分辨率晶体结构. 最后的晶体学 R_{free} 和 R 因子分别为 0.274 和 0.262 , 与标准键长和键角的均方根偏差分别为 0.002 nm 和 2.33° . 不对称单位的两个亚基不仅三维结构相似而且平均温度因子也接近, 这一结果说明以前报道的 $C2$ 晶型中亚基平均温度因子的显著差别很可能是由于两个亚基处于不同的晶体学环境引起的, 进一步支持了 holo-GAPDH 分子具有良好的 222 对称性.

关键词 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 别构酶 晶体结构

D-甘油醛-3-磷酸脱氢酶(以下简称 GAPDH)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. GAPDH 含有 4 个化学上等同的亚基, 每个亚基包括 333 个残基. GAPDH 四体的分子量约为 145 ku .

最令人感兴趣的是 GAPDH 酶的别构性质. 不同种属的 GAPDH 对辅酶结合表现出不同的协同性现象. 一般说来, 肌肉酶与辅酶结合表现为负协同性, 而酵母酶与辅酶结合则表现为正协同性. 特别是 GAPDH 与某些酰基化试剂反应时, 能表现为半位反应^[1]. 因此, GAPDH 成为研究别构作用的一个很好的模型.

迄今为止, 已有几个种属的高精度 GAPDH 的结构发表^[2-3]. GAPDH 4 个亚基结构是否等同是区别各种别构作用模型的关键问题之一. 所有已知结构包括我们组研究的 *Palinurus versicolor* (PV) 酶结构都支持 GAPDH 的 4 个亚基呈良好的 222 对称性, 即亚基结构是等同的. 在 PV 两种状态酶(holo-GAPDH, 全酶; CM-GAPDH, 羧甲基酶)的 $C2$ 晶型高分辨率结构中, 每个不对称单位所含两个亚基的平均 B 因子差别相当大, 在 holo-GAPDH 中差别甚至高出 1 倍. 这种 B 因子的差异到底是由于两个亚基处于不同的晶体学环境中引起的还是其本身就存在这种差异, 反映了某种结构不对称性? 这个问题的答案需要用新晶型来阐明. 新晶型的研究还可以使我们通过结构比较了解酶分子结构的刚性与柔性. 本文报道 PV holo-GAPDH 的新晶型 ($P4_21_2$) 的晶体培养, 分子置换法结构测定, 结构模型的描述以及两种晶型结构的比较.

1999-01-11 收稿, 1999-05-19 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 39370164, 39570169)

** 联系人 (E-mail: lin@sun5.ibt.ac.cn)

1 实验

1.1 晶体培养



图 1 holo-GAPDH 四方型晶体

PV GAPDH 的分离纯化按文献 [6] 进行. 采用座滴法培养晶体. 生长条件基本类似于宋时英等人^[7] 的报道, 即内液使用 1 mmol/L EDTA, 1.6 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 mg/mL GAPDH, pH 6.2 的 0.2 mol/L KH_2PO_4 和 K_2HPO_4 缓冲液, 总体积为 20 μL . 外液为含有 2.7 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 KH_2PO_4 和 K_2HPO_4 缓冲液 6 mL. 晶体生长条件中没有加入 NAD^+ , 而在以前的 C2 晶型生长条件中加入了 0.5 mmol/L NAD^+ . 放置在 18 $^\circ\text{C}$ 的恒温箱内, 4 d 左右出现晶体, 两周后生长基本完毕. 晶体呈矩形六面体, 最大尺寸为 0.6 mm (图 1). 晶体衍射能力超过 0.34 nm.

1.2 数据收集、处理和分子置换法结构解

在 Mar Research IP 数据收集仪上收集了一套 0.34 nm 分辨率的衍射数据. 使用 Denzo 和 Scalepack^[8] 软件来处理数据. 数据处理与分析表明该晶体空间群为 $\text{P4}_2\text{1}_2$, 晶胞参数为 $a=15.49$ nm, $c=8.03$ nm. 估算不对称单位含半个分子即两个亚基^[9]. 共获得 12 829 个独立衍射点, 合并 R_{merge} 为 15.2%, 平均数据重复次数为 4, 数据完整度 (>0.34 nm) 为 91.4%, 最外

壳层 (0.34~0.35 nm) 数据完整度为 83.9%.

用 AmoRe^[10] 程序进行交叉旋转函数和平移函数计算, 交叉旋转函数搜索所使用的模型是高分辨率 C2 晶型的 PV holo-GAPDH 中的绿亚基结构 (不包括 NAD^+ 分子和水分子). 将模型分子放置在一个边长为 10 nm 的立方格子中. 积分半径为 2 nm, 数据范围为 0.8~0.4 nm, 搜索角度范围为 0~45 $^\circ$. 然后用交叉旋转函数所得到的前 10 个峰作平移函数搜索, 数据范围仍为 0.8~0.4 nm, 得到一个十分稳定且突出的峰 A. 固定 A 的平移解, 对其余交叉旋转函数解进行进一步的平移搜索, 又得到另外一个十分突出的解 B. 刚体修正后, 这两个解的相关系数为 81.9%, R 因子为 25.7%, 结果见表 1.

1.3 结构修正

分子置换法所得到的两个解给出了 holo-GAPDH $\text{P4}_2\text{1}_2$ 晶型的初始结构. 用 XPLOR^[11] 程序对 1.0~0.4 nm 数据进行刚体修正. 在修正过程中使用了 RESTRAIN 非晶体学对称性制约. R_{free} 由 0.299 降到 0.292. 此时的电子密度图上清晰的显示出搜索模型中不存在的 NAD^+ 分子的密度 (图 2). 将刚体修正后的结构放入晶胞中, 用 TURBO^[12] 软件来查看其堆积的合理性, 可以看出分子在晶胞中没有发生重叠. 将此模型进行进一步的位置和 B 因子修正, 在修正过程中仍然使用 RESTRAIN 非晶体学对称性制约. 所使用的数据范围扩展为 1.0~0.34 nm. 根据 $(2F_o - F_c)$ 和 $(F_o - F_c)$ 电子密度图表现, 加入了 NAD^+ 分子和少量结构水.

表 1 分子置换法结果^{a)}

交叉旋转函数结果								
No	α	β	γ	corr				
A	43.50	23.80	1.99	16.7(13.7)				
B	45.28	23.18	179.13	14.0(13.7)				
平移函数结果								
	No	x	y	z	corr	R		
P4 ₂ 2	A	0.116	0.812	0.221	40.3(23.3)	45.8(51.0)		
	B	0.370	0.798	0.076	76.3(24.3)	29.5(50.6)		
刚体修正结果								
No	α	β	γ	x	y	z	corr	R
A	45.10	23.97	-0.46	0.117	0.812	0.219	81.9	25.7
B	45.95	23.74	179.64	0.369	0.798	0.075	81.9	25.7

a) A、B 为亚基编号, corr 为相关系数, α, β, γ 为 Euler 角, x, y, z 为分数坐标, 括号内为最高噪音峰值

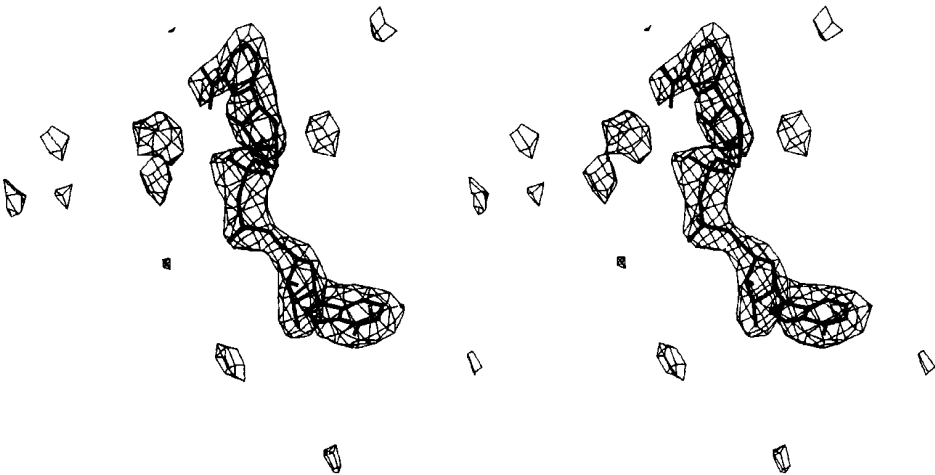


图 2 亚基中 NAD⁺ 分子的电子密度

2 结果

2.1 结构模型的精度

最后的模型包括 5 012 个非氢蛋白原子, 2 个 NAD⁺ 分子, 4 个 SO₄²⁻ 离子和 16 个水分子. R_{free} 为 0.274, R 因子为 0.262, 与标准键长和键角的均方根偏差分别为 0.002 nm 和 2.33°. 结构模型和电子密度图吻合情况良好, Ramachandran 图也比较合理. 这些结果都说明了分子置换法所确定的 hol-GAPDH 新晶型结构是可靠的. 为了探讨不同亚基 B 因子是否存在差别, 进行了不加非晶体学对称性制约的结构修正, 结果表明 2 个亚基的平均 B 因子是接近的, 分别是 0.32 和 0.38 nm². 下文讨论 B 因子时, 以没有使用非晶体学对称性制约进行修正后的模型数据为依据.

2.2 与 C2 晶型的结构比较

2.2.1 单体 GAPDH 是一个寡聚蛋白, 4 个亚基命名为红、绿、蓝和黄亚基^[13]. 在 C2 晶型高分辨率的结构中, 不对称单位的两个亚基(红亚基, 绿亚基)具有很好的非晶体学二重对称

性,两个亚基的 $C\alpha$ 原子均方根偏差为 0.019 9 nm. 在 P42₁2 晶型结构中,不对称单位中的两个亚基结构也极为相似. 因此,下面对两种晶型单体的比较,都只取不对称单位两个亚基中的 1 个,即绿亚基.

图 3 显示了两种不同晶型的单体 $C\alpha$ 原子叠合图. 两者的均方根偏差为 0.041 1 nm, 其中催化结构域(catalytic domain)的 $C\alpha$ 原子均方根偏差为 0.033 2 nm, NAD^+ -结合结构域(binding domain)为 0.045 6 nm, 这说明两种晶型的单体结构十分接近. 每个残基的 $C\alpha$ 原子均方根偏差随残基号变化见图 4. 在催化结构域中, $C\alpha$ 原子偏差较大的氨基酸残基为 Lys191 (0.090 nm) 和 Asp192 (0.088 nm). 在 NAD^+ -结合结构域中, $C\alpha$ 原子偏差较大的残基为 Glu21 (0.100 nm), Gly55 (0.080 nm), Asp61 (0.122 nm), Gly62 (0.070 nm), Ser333 (0.212 nm)和 Ala334 (0.227 nm). 其中 Asp61 在 C2 晶型中位于分子表面,电子密度表现比较差,但在 P42₁2 晶型中,它与相邻分子的 Lys2 生成氢键,这使得这个残基在两种晶型结构中表现出较大的差异并影响到 Gly62 的位置. Glu21, Gly55, Lys191 和 Asp192 都位于分子表面,靠近溶剂区,活动比较自由. Ser333 和 Ala334 是位于蛋白质 C 末端的两个残基,它们的活动性也比较大,难以确定其准确位置. 在高分辨率的 C2 晶型结构中,这两个残基的密度表现也不好. 去掉这两个残基后,整个亚基 $C\alpha$ 原子叠合的最小二乘偏差降为 0.036 nm, NAD^+ -结合结构域相应值降为 0.038 nm.

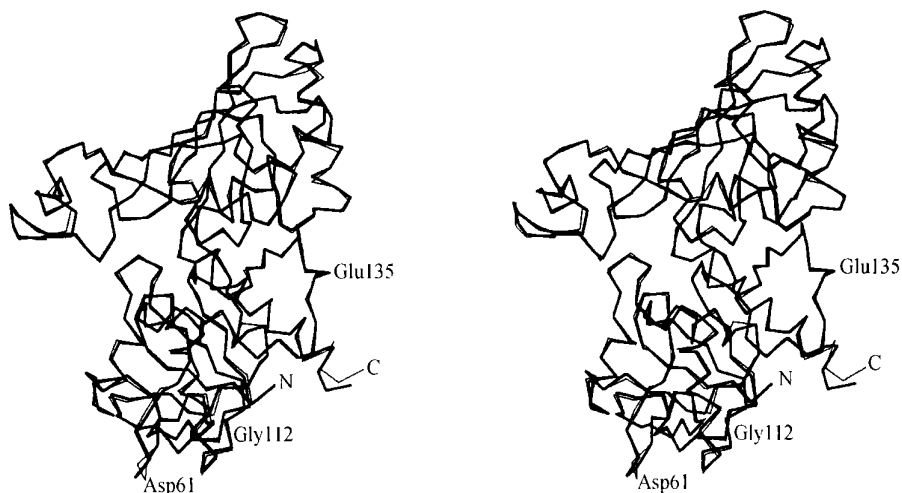


图 3 两种晶型的绿亚基 $C\alpha$ 原子叠合图

细线为 C2 晶型, 粗线为 P42₁2 晶型

在这两种晶型结构中, NAD^+ 分子的位置几乎完全叠合, 这说明不同的晶型对辅酶 NAD^+ 分子的结合是极其相似的. 在 P42₁2 晶型中, NAD^+ 的占有率不是很高, 大概占 85%. 这可能与晶体生长的条件有关, 因为在 P42₁2 晶型的晶体生长中, NAD^+ 的含量不是过量的.

2.2.2 四体 不同种属的 GAPDH 高分辨率结构研究表明^[2~5], GAPDH 4 个亚基呈良好的 222 对称. PV GAPDH 两种晶型结构中, 四体的 Q 轴均为晶体学对称轴, 不对称单位所含两个亚基均以一非晶体学对称轴(R 轴)相联系. 关于分子轴(PQR)的定义见文献[13].

两种晶型的四体结构同单体结构一样也是极为相似的, 其 $C\alpha$ 原子均方根偏差为 0.046

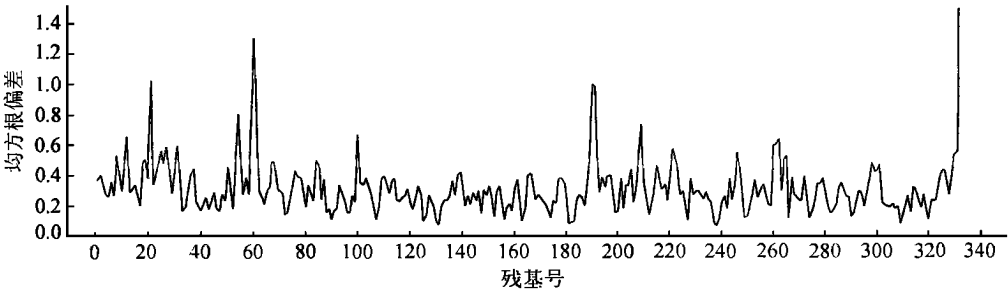


图 4 两种晶型绿亚基对应残基的 α 原子均方根偏差随残基号变化图

nm. 不仅如此, 在亚基之间沿 PQR 3 个分子轴的界面中, 两种晶型的盐键及氢键作用也几乎没有什么差别. 由于 P4₂1₂ 晶型的分辨率比较低, 对界面之间的溶剂分子结构无法进行比较. 但从上述整体结构及界面作用的相似程度来推测, 两种晶型中亚基间溶剂分子的结构和亚基内溶剂分子的结构也应该是相似的. SO_4^{2-} 的位置在两种晶型结构中比较近似就是一个很好的例证. 虽然, SO_4^{2-} 的占有率在 P4₂1₂ 结构中并不很高. 但是, 从 $(2F_o - F_c)$ 和 $(F_o - F_c)$ 电子密度图上还是能清楚地确定其位置.

2.2.3 晶体堆积 这两种晶型的四体堆积表现出一定的相似性. 每个四体都与周围 6 个四体相接触, 图 5(a)、(b) 显示出 sym0 四体与共处于 *ab* 面的 4 个相邻四体 (sym1, sym2, sym3, sym4) 的位置. 另外两个四体 (sym5, sym6) 未在图上标出, 它们是由 sym0 沿 *c* 轴平移产生. sym6 位于纸面上方, sym5 位于纸面下方. 在四方晶型中, 四体的 Q 轴与晶体学 *a* + *b* 轴重合, P 轴则与 *a*, *b* 面 (即纸面) 相交约 25°, 而在 C2 晶型中, 四体的 Q 轴与晶体学 *b* 轴重合, P 轴与 *a* 轴重合, 在图 (b) 中与纸面相交也是 25°. 因此, 两个投影图显示的四体结构是相似的, 但是在四方晶型中共处于 *ab* 面上与 sym0 相邻的四体却沿着 *c* 轴旋转了 90°. 两种晶型的四体间独立的相互作用列在表 2 中.

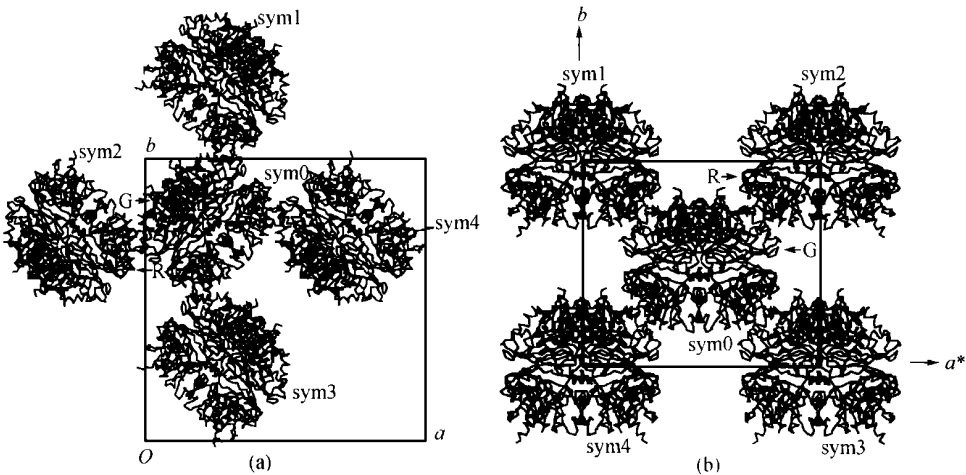


图 5 两种晶型晶体堆积比较(沿 *c* 轴正方向的投影图)
(a) P4₂1₂ 晶型, (b) C2 晶型

表 2 两种晶型的四体与周围对称性关联的四体间作用力比较^{a)}

P4 ₂ 2 晶型			C2 晶型		
Atom1	Atom2	Dist/ nm	Atom1	Atom2	Dist/ nm
sym0	sym2		sym0	sym2	
G-OD2-Asp254	R-NZ- Lys159	0.312	G-OE2-Glu135	R-OE1- Glu135	0.340
G-O-Glu249	R-OE2- Glu163	0.279	G-OE2-Glu135	R-OE2- Glu135	0.290
G-Asn164	R-Pro266	vdw	G-O-Glu135	R-NZ- Lys136	0.309
G-Lys248	R-Asn164	vdw	G-Lys136	R- Glu135	vdw
G-Asp253	R- Glu135	vdw	G-Glu163	R-Pro266	vdw
G-Ala257	R-Pro266	vdw	G-Glu163	R- Gly265	vdw
G-Ala257	R- Gly265	vdw	G- Gly265	R- Glu163	vdw
G-Ala261	R- Gly265	vdw	G-Pro266	R- Glu163	vdw
sym0	sym1		G-NE2-Gln268	R-O- Glu163	0.328
G-OD1-AspP61	R-NZ- Lys2	0.349	sym0	sym6	
sym0	sym6		G-OE1- Glu103	B-OE1- Glu103	0.338
G-Phe109	B-Phe109	vdw	G-Ile102	B- Lys110	vdw
G-Lysl10	B- Lys142	vdw	G-Lys110	B- Lys142	vdw

a) G 为绿亚基, R 为红亚基, B 为蓝亚基, vdw 为 van der Walls 力. sym0 为空间中任意一个 GAPDH 四体. sym1, sym2, sym6 为 sym0 四体周围根据对称性操作产生的四体. 接触距离小于 0.35 nm 的原子被统计在表内

C2 晶型 *ab* 面上的接触部位涉及红、绿亚基的相同部位, 这个部位由催化结构域中的转角 (Gly265-Gly269), α -螺旋 (Ser148-Glu166)和 NAD^+ -结合结构域中的环区 (Glu135-Lys136)组成. 两个亚基在此部位参与相互作用的残基基本相同, 这些残基在空间中的位置呈平行于 *R* 轴方向的近似二重轴对称. 四方晶型 *ab* 面上的分子接触对红亚基来说涉及与 C2 类似的部位, 但对绿亚基却涉及转角 (246-251)和螺旋 (251-264), 另外还存在 NAD^+ -结合结构域之间的相互作用即绿亚基的 Asp61 与红亚基的 Lys2. 这个部位在 C2 晶型中不存在. 两种晶型沿 *c* 轴方向的接触部位都涉及绿亚基 NAD^+ -结合结构域的 α -螺旋 (Thr101-Gly112)与蓝亚基的同一 α -螺旋和 β -折叠 (Lys142-Asn146), 这个接触部位只与蓝绿亚基发生联系, 与红、黄亚基无关.

由表 2 可以看出, 两种晶型四体间相互作用强度接近, 但按结构域分布不同. 在 C2 晶型中, 总共有 12 对相互作用力, 7 对发生在两个四体的 NAD^+ -结合结构域之间, 5 对发生在催化结构域之间. 而在 P4₂2 晶型中, 情况刚好相反, 总共有 11 对相互作用力, 3 对发生在两个四体的 NAD^+ -结合结构域之间, 7 对发生在催化结构域之间, 另外 1 对发生在一个四体的 NAD^+ -结合结构域和另一个四体的催化结构域之间.

3 讨论

四方晶体衍射数据分辨率只有 0.34 nm, 为了提高数据量与参数量之比, 结构修正中使用了 RESTRAIN 非晶体学对称性制约. 高分辨率 X 射线晶体学研究表明 GAPDH 亚基结构是极其相似的, 其差别均在实验误差范围内^[2~9]. 因而使用 RESTRAIN 非晶体学对称性制约是合理的, 实际效果也比较好.

从两种晶型的结构比较来看, 两者的单体结构和四体结构都非常相似. 虽然不同的晶体堆积导致不完全相同的四体之间的接触部位, 但是, 没有发现这些接触部位的结构有明显的变化. 这些结果说明 GAPDH 分子的三维结构柔性很小, 不易受晶体堆积力的影响.

由于分子堆积不同, 两种晶型 GAPDH 四体间作用力有较大的差异. 这使得对以前 C2 晶型结构研究中所遗留下来的一个重要问题可以加以详细研究. 这个问题就是: C2 晶型不对称单位中的两个亚基的平均 B 因子有很大的差别, 这一事实是由于晶体堆积引起的, 还是暗示着这两个亚基本身就不对称? 现在, 在新晶型结构中, 同一不对称单位的两个亚基的平均 B 因子比较接近. 这一结果提示 C2 晶型中的平均 B 因子差别是由于两个亚基所受到的晶格作用力不同而引起的. 在两种晶型中, 绿亚基的四体间作用都分布在两个相距较远的接触部位, 使得整个亚基相当稳定, 平均 B 因子也相当低, 这是两种晶型的共同点. 但是发生在红亚基 NAD^+ -结合结构域上的参与四体间作用的情况不一样. 在 C2 晶型中, 参与四体间作用的部位只有一个即位于亚基腰部的 Glu135 和 Lys136. 在 P4₂12 晶型中, 除 Glu135 外, 参与四体间作用增加了 1 个残基 (Lys2), 而它的位置远离 Glu135. 这个差别导致了红亚基 NAD^+ -结合结构域在 P4₂12 晶型中比较稳定而在 C2 晶型中表现出一定的柔性, 使得不对称单位中两个亚基的平均 B 因子在 C2 晶型中差别显著 (0.29 和 0.53 nm²), 而在 P4₂12 晶型中却很接近 (0.33 和 0.37 nm²) 的事实. 排除了在 C2 晶型高分辨率 (0.2 nm) 结构中两亚基平均 B 因子的差别暗示着分子固有的不对称性这个因素后, 就更能充分地说明 GAPDH 四体具有良好的 222 对称性, 同时也支持 GAPDH 的负协同性机制应由配基诱导这个机理来解释. 对 GAPDH 的负协同性机制正在做进一步的研究.

致谢 感谢邹承鲁教授对此项研究的关心、支持和周筠梅教授在分离纯化工作上的指导.

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, Sect D* 1998, 54(4): 558 ~ 569
- 3 Skarzynski T, Moody P C E, Wonacott A J. Structure of holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* 1987, 193: 171 ~ 187
- 4 Komdörfer I, Steipe B, Huber R, et al. The crystal structure of holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyper-thermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *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* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: implication for NAD binding and cooperativity. *J Mol Biol* 1996, 257: 814 ~ 833
- 6 Allison W S, Kaplan N O. The comparative enzymology of triosephosphate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 1964, 239(7): 2140 ~ 2152
- 7 宋时英, 高义贵, 谢贵福, 等. 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
- 8 Otwinowski Z, Minor W. Processing X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol* 1997, 276: 307 ~ 326
- 9 Matthew B W. Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol* 1968, 33: 491 ~ 497
- 10 Navaza J. AmoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Cryst, Sect A*, 1994, 50(4): 760 ~ 763
- 11 Brunger A T. XPLOR Manual, Version 3.1. New Haven: Yale University, 1992
- 12 Roussel A, Cambilau C. TURBO-FRODO. In: Silicon Graphics Geometry Partners Directory. Mountain View: Silicon Graphics, 1989. 77 ~ 78
- 13 Buehner M, Ford G C, Moras D, et al. Three-dimensional structure of D-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Mol Biol* 1974, 90: 25 ~ 49