



# 应用核磁共振波谱技术研究蛋白质相互作用

施蕴渝, 吴季辉

合肥微尺度物质科学国家实验室(筹), 中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230027

E-mail: [yyshi@ustc.edu.cn](mailto:yyshi@ustc.edu.cn), [wujihui@ustc.edu.cn](mailto:wujihui@ustc.edu.cn)

2008-12-07 收稿, 2009-02-11 接受

国家重大科学研究计划(批准号: 2002CB713806, 2006CB806507, 2006CB910201)、国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA02A315)和国家自然科学基金(批准号: 30121001, 30570361, 30670426)资助项目

**摘要** 从结构生物学角度研究蛋白质与蛋白质相互作用十分重要. 核磁共振波谱技术是目前结构生物学的主要研究方法之一, 该方法具有其他技术所不可替代的重要作用. 核磁共振波谱技术可以在接近生理条件下研究蛋白质相互作用, 特别适合研究瞬时存在的动态复合物. 该技术是少数几种能够提供无结构或有部分结构的蛋白质以及蛋白质折叠过程等多方面信息的方法. 核磁共振波谱技术还可以在多种时间尺度下提供蛋白质的动力学信息. 本文以中国科学技术大学生物核磁共振波谱实验室的研究实例对上述观点进行阐述.

**关键词**

蛋白质  
相互作用  
核磁共振  
蛋白质的动态结构  
蛋白质动力学  
内源无结构的蛋白质

细胞是生命活动的最基本单元. 人类有2~3万个基因, 有大约10万个蛋白质. 它们构成了细胞中复杂的蛋白质相互作用网络. 蛋白质是重要的生命活动载体和生物功能的执行者. 蛋白质之间, 蛋白质与核酸、脂类、糖类之间以及与各种配基之间可以形成稳定的复合物和不稳定的动态复合物. 对蛋白质复杂多样的结构功能、相互作用和动态变化的深入研究, 将有助于在分子、细胞水平揭示生命现象的本质.

酵母双杂交、Far western blot或者免疫共沉淀、电泳迁移实验、表面等离子体共振谱(surface plasmon resonance, SPR)、等温滴定量热(isothermal titration calorimetry, ITC)、超离心沉降平衡、噬菌体展示、动态光散射、荧光去偏振以及GST-pull down等实验可以在离体情况下研究蛋白质相互作用; 荧光共振能量转移的显微镜分析、荧光共振能量转移的流式细胞仪分析、荧光相关谱、激光共聚焦研究细胞内的蛋白质共定位以及蛋白质交联等方法可研究活细胞中的蛋白质相互作用. 除此而外, 还有使用二维凝胶或二维液相色谱与同位素标识和质谱结合的蛋白质组学

方法、生物信息学方法研究和预测蛋白质相互作用等. 但是如果需要知道二者相互作用的界面, 如果要回答两个蛋白质相互作用涉及的氨基酸残基, 并对药物设计与药物筛选提供指导性的信息, 对蛋白质结构的研究是必不可少的<sup>[1,2]</sup>. X-射线晶体衍射、核磁共振波谱技术(nuclear magnetic resonance, NMR)、冷冻电子显微镜是目前结构生物学最主要的研究方法.

## 1 核磁共振波谱技术在研究细胞中蛋白质相互作用中的应用

在细胞信号转导过程中, 为了达到调控的目的, 大多数蛋白质相互作用是动态的, 是弱相互作用(解离常数,  $K_d$ 常常大于 $10^{-4}$  mol/L). 许多瞬时存在的复合物是非常不稳定的, 因此很难得到用于结构研究的晶体. 核磁共振波谱技术特别适合于研究这类动态的复合物. 通过滴定实验, 对化学位移扰动进行分析, 可以确定蛋白质相互作用界面. 该方法十分灵敏, 能够检测直到 $K_d$ 为 $10^{-2}$  mol/L的弱相互作用<sup>[3,4]</sup>.

目前已发现细胞内存在许多大片段的内源性无结

**引用格式:** 施蕴渝, 吴季辉. 应用核磁共振波谱技术研究蛋白质相互作用. 科学通报, 2009, 54(8): 1017~1022

Shi Y Y, Wu J H. Protein interaction and change of protein conformation and dynamics (in Chinese). Chinese Sci Bull (Chinese Ver), 2009, 54(8): 1017-1022

构蛋白质(disordered proteins). 无结构的蛋白质包括去折叠状态的蛋白质、熔融球蛋白、折叠中间态、变性蛋白质, 还包括内源天然无结构的蛋白质. 研究这些无结构的蛋白质对于了解蛋白质的折叠、聚合以及纤维化十分重要. 它们与Prion病、帕金森氏病、埃茨海默病等淀粉状纤维变性疾病有关. 目前估计有三分之一的真核生物蛋白质含有超过连续 30 个氨基酸残基组成的无结构序列. 在与肿瘤相关的信号蛋白质中, 这个比例还要高. 一些内源性无结构的蛋白质在蛋白质-蛋白质相互作用过程中起了关键作用. 在蛋白质结合过程中会发生无序向有序结构的转换. 对于研究这种无结构的蛋白质, X-射线晶体衍射无能为力. 核磁共振波谱技术是少数几种能提供无结构或有部分结构的蛋白质以及蛋白质折叠过程等多方面信息的方法<sup>[5]</sup>. 最近NMR技术的研究进展使去折叠或部分折叠蛋白质分子的主链共振峰能得到完全的认证, 并有可能细致地了解这些构象状态的结构和动力学特征. 研究人员可以根据所谓的二级化学位移(secondary chemical shifts)得到蛋白质二级结构的信息. 利用脉冲场梯度核磁扩散实验, 可以得到平移扩散系数, 并由此计算蛋白质的流体力学半径. 由于平常的NOE效应限于 5 Å范围, 所以在无结构的蛋白质中NOE常常只在残基内部被观察到. 用顺磁探针对于蛋白质进行标记, 通过顺磁弛豫增强效应可以得到 20~25 Å长程信息. 同时, 也可以应用残存偶极耦合实验(RDC)研究无结构的蛋白质或者部分折叠态的蛋白质, 给出主链拓扑方面的信息.

蛋白质的三维结构主要靠非共价相互作用, 如氢键、盐键、范德华相互作用、疏水相互作用所维系. 蛋白质分子具有柔性. 在蛋白质-蛋白质以及蛋白质与配基相互作用过程中, 不仅蛋白质结构会发生变化, 同时其动力学性质也会变化. 蛋白质的柔性及运动性与功能有密切关系, 如酶的柔性及运动性对于其功能态的热力学稳定性及催化功能十分重要. 由于蛋白质是一个残基间相互耦联的动力学系统, 配基结合将会引起动力学信息在蛋白质内部传递, 引起别构效应. 核磁共振波谱技术特别适合研究蛋白质的动力学, 得到的动力学信息可以特别确定到所研究的基团. 通过自旋-晶格弛豫时间( $T_1$ )、自旋-自旋弛豫时间( $T_2$ )及异核NOE的实验数据的分析, 可以获得蛋白质在多个时间尺度的动力学信息. 近年来, 还发展了一种专门用于测定生物大分子在微秒-毫秒时间尺度的动力学的方法: relaxation dispersion experiment (图 1)<sup>[6-8]</sup>.

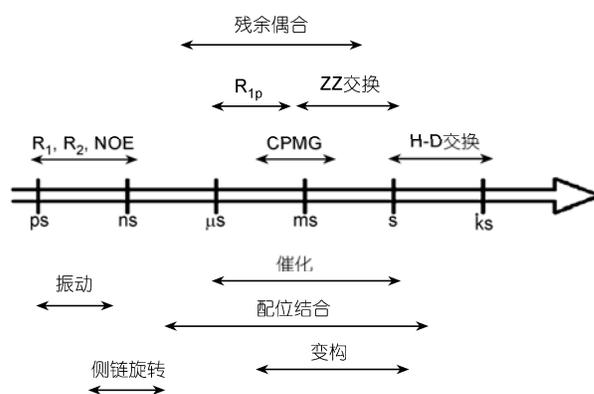


图 1 核磁共振波谱技术所能研究的蛋白质运动的时间尺度<sup>[7]</sup>

## 2 中国科学技术大学生物核磁共振波谱实验室的研究工作

中国科学技术大学生命科学学院生物核磁共振波谱实验室在过去 10 多年来建立了用核磁共振波谱技术研究蛋白质结构与动力学的实验平台, 开展了基因克隆与表达, 蛋白质分离、纯化、性质鉴定, 核磁共振波谱实验, 结构解析, 动力学研究以及蛋白质与蛋白质、蛋白质与配基相互作用等方面的研究, 重点研究真核基因表达调控相关蛋白质、细胞连接处相关蛋白质; 研究了一批具有重要生理功能, 与疾病相关的蛋白质与蛋白质相互作用的三维结构和动力学. 具体的研究成果可参考文献<sup>[9,10]</sup>和网页<http://bionmr.ustc.edu.cn/publications/publications.htm>. 以下举例说明.

### 2.1 人的白血病相关的Rho鸟苷酸交换因子LARG的PDZ结构域与Plexin-B1相互作用<sup>[11]</sup>

LARG在急性髓样白血病人体内, 作为mixed-lineage leukemia (MLMLL)蛋白的融合蛋白而被发现(图 2)<sup>[12]</sup>. LARG蛋白全长为 1544 个氨基酸残基, 包括PDZ, RGS, DH和PH四个结构域. MLL-LARG形成的融合蛋白包括MLL的N端区域和LARG的C端区域, 其中PDZ结构域缺失.

Plexins是细胞表面Semaphorins的受体家族蛋白, 它在神经细胞的伸缩和塌陷过程中发挥非常重要的作用. Plexin-B1 可以直接与GTP结合的Rac相互作用, 通过抑制Rac从而抑制Rac依赖的信号通路<sup>[14]</sup>. 研究认为, LARG PDZ结构域与plexin B1 的相互作用可以激活Rho A, 调控细胞骨架的重排, 从而影响轴

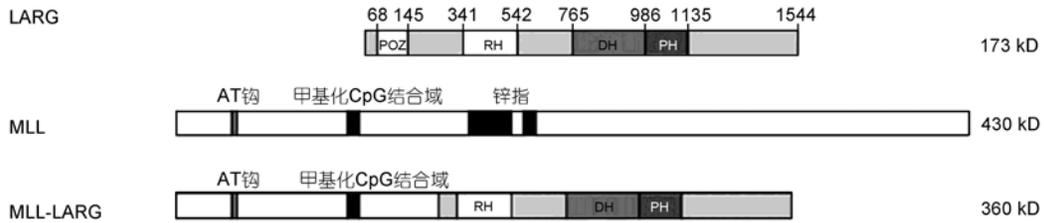


图2 LARG与MLL形成融合蛋白时的序列变化<sup>[13]</sup>

突的正确导向,进一步影响轴突生长锥的坍塌和细胞迁移<sup>[15]</sup>。迄今为止,没有二者相互作用的结构和动力学方面的详细信息。我们通过核磁共振波谱技术,解析了LARG PDZ在自由和复合物状态下的溶液结构。研究发现,LARG PDZ和plexin B1羧基末端肽段形成复合物以后,结构发生了明显的变化。其中最主要的变化发生在 $\beta$ B/ $\beta$ C环和 $\beta$ E/ $\alpha$ B环两段区域。在自由状态下,LARG PDZ两段环,由于柔性太大没有确定的构象,观测不到共振信号。但是用plexin B1末端小肽滴定之后,它们的共振信号出现了。比较自由和复合物状态下的溶液结构,主链原子间的均方根偏差为1.7 Å。与小肽结合状态下的PDZ结构中的第2个 $\beta$ 折叠( $\beta$ B)顺时针方向偏转10°,第2个 $\alpha$ 螺旋( $\alpha$ B)逆时针方向偏转大约15°。最终造成的结果是, $\beta$ B与 $\alpha$ B相互平行。疏水口袋的底部由来自自由状态下的接近“闭合”的状态变为“打开”的状态,增加了 $\beta$ B/ $\alpha$ B结合沟槽的溶剂可接近表面积。同时,氨基酸H127和V131的侧链构象发生了较为明显的改变,在加入小肽以后,H127的咪唑环向 $\alpha$ B靠拢,远离结合沟槽;V131的一个甲基由伸向结合沟槽内变为远离结合沟槽,伸向螺旋内部。总体看来,LARG PDZ与配基结合沟槽附近的区域发生了明显的结构变化,特别是结合沟槽的底部,底部宽度由自由状态下的 $(6.75 \pm 0.27)$  Å扩大为 $(9.75 \pm 0.55)$  Å(图3(b))。这种构象变化与其他PDZ在结合小肽前后发生构象变化的部位不一样。

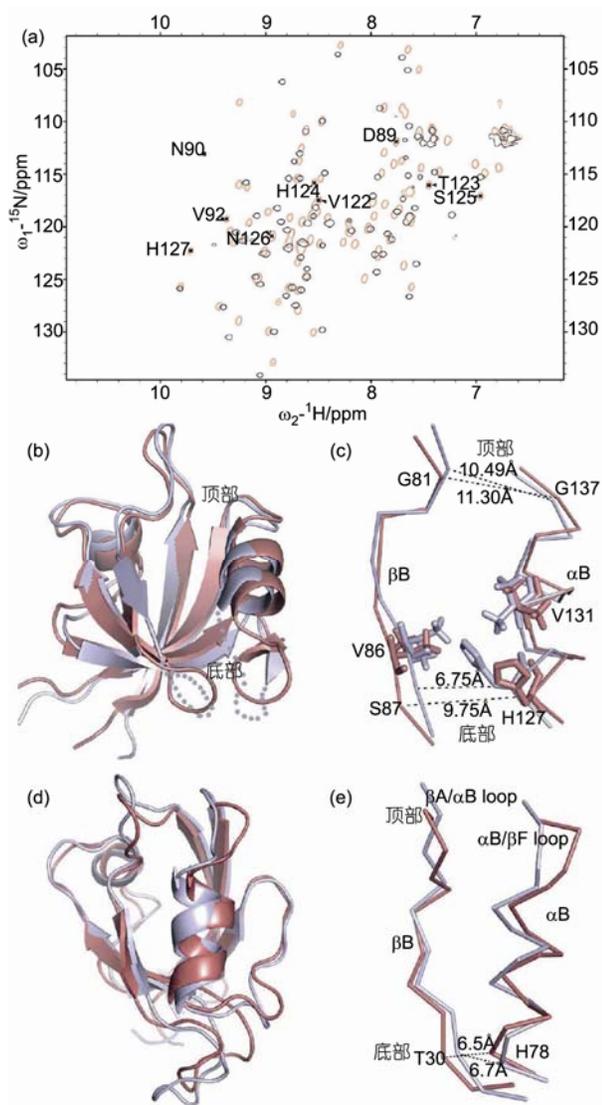
为了寻找LARG PDZ结构变化,以及在自由态柔性区域氨基酸残基信号消失的原因,我们探索了LARG PDZ的动力学性质。我们测量了 $T_1$ ,  $T_2$ , NOE值。通过约化的谱密度函数来分析主链弛豫数据。

自由状态的LARG PDZ显示出较大幅度 and 范围的内部运动,包括皮秒-纳秒时间尺度和微秒-毫秒时间尺度的运动。较大的 $J(0)$ 值和较大的 $J(0.87\omega_H)$ 值,

强烈暗示着这些残基的毫秒-微秒时间尺度上的运动。 $\beta$ B/ $\beta$ C loop和 $\beta$ E/ $\alpha$ B loop区域的氨基酸残基在两种构象或者多种构象之间进行交换,引起信号消失。

处于与PlexinB1末端小肽结合状态下的LARG PDZ结构域,二级结构区域的大部分残基的 $J(0.87\omega_H)$ 都小于7.5 ps/rad, $J(0)$ 值也相对较为均一(图4)。在此状态下的蛋白没有显示出明显的快速和慢速的内部运动,说明小肽的加入很大程度上抑制了蛋白的内部运动。这主要是由于小肽的加入、蛋白和小肽之间的氢键相互作用、静电相互作用以及疏水相互作用在很大程度上限制了蛋白质自由活动的空间范围,使得蛋白质的运动性减弱<sup>[14]</sup>。通过CPMG实验,我们分析了自由状态下,低小肽浓度状态(蛋白质:小肽浓度比为10:1)和处于复合物状态下的LARG PDZ的构象交换对于横向弛豫速率的贡献情况以及构象交换的速率。在自由状态下,蛋白质的大部分氨基酸残基显示出毫秒量级的内部运动,它们主要集中在 $\beta$ B/ $\alpha$ B结合沟上或者周围。在加入少量小肽之后,毫秒量级的运动更加明显,结合沟附近的氨基酸残基的构象交换对于横向弛豫的贡献更加明显,交换速率降低。加入过量的plexin B1末端小肽使99%以上的蛋白质处于结合状态,蛋白质和小肽之间的相互作用限制了蛋白质运动的空间自由性,没有明显的毫秒量级的内部运动。

突变和等温滴定量热(ITC)实验证实, $\beta$ B/ $\beta$ C和 $\beta$ E/ $\alpha$ B loop区域的氨基酸残基的构象会影响LARG PDZ和小肽之间的相互作用,暗示了LARG PDZ动力学和结构变化之间的关系,即 $\beta$ B/ $\beta$ C loop和 $\beta$ E/ $\alpha$ B loop区域在不同构象之间的交换以及构象的易变性可以较好地辅助 $\beta$ B/ $\alpha$ B结合沟进行构象的变化而容纳配体(图3(e))。在结合沟附近的氨基酸残基经历着明显的毫秒量级的内部运动,这种构象的柔性能够很好地帮助蛋白质进行不同的构象变化,从而结合不同的小肽。

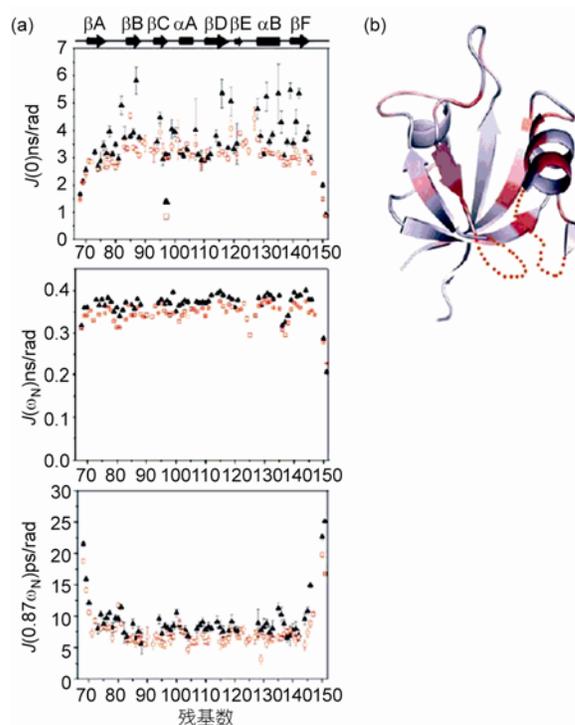


**图3 LARG-PDZ 在自由和复合物状态下的结构变化以及其他 PDZ 结构域在结合配体前后的构象变化**

(a) LARG-PDZ 在自由(黑色)和复合物(红色)两种状态下的<sup>15</sup>N,<sup>1</sup>H-HSQC 谱的叠合。βB/βC 环和βE/αB 环两段区域的氨基酸的交叉峰被标记。(b) LARG-PDZ 在自由(黑色)和复合物状态(红色)下的结构叠合。(c) LARG-PDZ βB/αB 结合沟的顶部和底部的距离, 以及 H127 及 V131 侧链的构象变化。(d) PTP-BL PDZ2 在自由(PDB 号 1GM1, 黑色)和复合物(PDB 号 1VJ6, 红色)状态下的结构叠合。(e) PTP-BL PDZ2 βB/αB 结合沟的顶部和底部的距离的变化<sup>[11]</sup>

## 2.2 SKIP 内大片段内源无结构的肽段与 PPIL1 结合发生的无序-有序的转变<sup>[16]</sup>

前体 mRNA 剪切过程对于绝大多数的真核基因表达都是不可缺少的。前体 mRNA 的剪切在真核生物体内由剪切体复合物负责。已经证明 SKIP (spli-



**图4 约化的谱密度函数分析**

(a) LARG PDZ 结构域在自由和复合物状态下的 3 个频率下的谱密度函数,  $J(0)$ ,  $J(\omega_N)$  及  $J(0.87\omega_H)$ 。(b) 自由状态下的 LARG PDZ 结构域的结构。  $J(0)$  值大于 4.51 ns/rad(平均值加上一个标准偏差)的残基标记成暗红色,  $J(0)$  值在 3.6~4.51 ns/rad 之间的氨基酸被标记成淡红色<sup>[11]</sup>

ceosomal component and transcriptional coregulator)在剪切体活化过程中加入 45S snRNP, 参与了剪切体活化过程。在这过程中 SKIP 募集 PPIL1。PPIL1 是脯氨酸顺反异构酶超家族中 cyclophilin 家族的成员。我们用多维核磁共振波谱技术测定了 PPIL1 的三维结构。GST pull-down 和 Western blot 实验证实, PPIL1 与剪切体蛋白质 SKIP N 端(残基 59~129, SKIPN))可以结合, 其结合常数为  $10^{-7}$  mmol/L 量级。化学位移扰动实验结果显示, PPIL1 与剪切体蛋白质 SKIP 的 SKIPN 的结合界面, 这是一个全新的界面。脯氨酸顺反异构酶抑制剂 cyclosporine A 的加入不影响 SKIP 结合, 这说明 PPIL1, SKIP 和 cyclosporine A 可以形成三元复合物。核磁谱、CD 光谱、差示扫描微量热实验表明, 自由状态下的 SKIPN (残基 59~129)是一个进化过程中保守的区域, 它是一个天然无结构的蛋白质模块(motif), 具有很大的柔性。当 SKIPN 与 PPIL1 结合后, SKIPN 的前 21 个氨基酸(残基 59~79,

PBF)构象发生很大的变化,由无结构的状态转变为有结构的状态。我们用 NMR 的方法测定了 PPIL1-PBF 复合物的溶液结构。结构表明,复合物状态下和自由状态下 PPIL1 的结构类似,二级结构及其走向没有改变。PPIL1 上与 PBF 结合处的氨基酸在整体上有些移动。复合物状态的 PBF 通过静电相互作用与疏水相互作用与 PPIL1 结合,呈现有序的结构。PBF 可以分为 3 个片段(残基 59~67, 68~73, 74~79)。主链走向呈现一个“钩状”的结构,其中两个部分可以观测到 NOE。NMR 滴定和突变实验证明,3 个片段之间的相互作用对于 PPIL1:PBF 复合物的形成是必需的。SKIPN 无序-有序的转化为剪切体中内源性无结构的蛋白质可能发挥重要生物学功能提供了一个重要例证。

### 3 结论

综上所述,核磁共振波谱技术在生物学中,特别

在结构生物学、蛋白质科学研究中有广泛应用。对于在原子分辨率下研究柔性很大的蛋白质,研究内源无结构的蛋白质,研究被长的 linker 连接的多个结构域的蛋白质,以及研究蛋白质的动力学特性,它可以起到其他技术所不可替代的作用。目前这一技术还在发展之中,包括固体核磁、核磁成像等。生物核磁共振波谱技术属交叉学科。多维核磁共振波谱技术研究生物大分子结构、动力学与功能的理论基础是核自旋系统密度算符的演化理论,通过复杂的脉冲序列实现相干路径的选择。由于研究的对象是生物大分子,所以研究工作又涉及到分子生物学、生物化学、计算生物学、细胞生物学等学科。尽管 X-射线晶体衍射、冷冻电子显微镜在结构生物学领域已经取得重大成就,但是核磁共振波谱技术仍然是结构生物学领域重要的、不可或缺的研究方法。

致谢 对现在以及过去,曾在我们实验室工作过的研究生及博士后表示衷心感谢。对张家海、蒲春雷、王以庶、唐雅君表示感谢。对在过去几十年间,在我们十分困难的情况下,所有支持、帮助我们的人表示感谢。

### 参考文献

- 1 Fu H. Protein-protein interactions: methods and applications. Totowa: Humana Press, 2004
- 2 Golemis E. Protein-protein interactions: A molecular cloning manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002
- 3 Takeuchi K, Wagner G. NMR studies of protein interactions. *Curr Opin Struct Biol*, 2006, 16: 109—117[[doi](#)]
- 4 Vaynberg J, Qin J. Weak protein-protein interactions as probed by NMR spectroscopy. *Trends Biotechnol*, 2006, 24: 22—27[[doi](#)]
- 5 Mittag T, Forman-Kay J D. Atomic-level characterization of disordered protein ensembles. *Curr Opin Struct Biol*, 2007, 17: 3—14[[doi](#)]
- 6 Mittermaier A, Kay L E. New tools provide new insights in NMR studies of protein dynamics. *Science*, 2006, 312: 224—228[[doi](#)]
- 7 Palmer A G 3rd. NMR characterization of the dynamics of biomacromolecules. *Chem Rev*, 2004, 104: 3623—3640[[doi](#)]
- 8 Palmer A G 3rd, Massi F. Characterization of the dynamics of biomacromolecules using rotating-frame spin relaxation NMR spectroscopy. *Chem Rev*, 2006, 106: 1700—1719[[doi](#)]
- 9 Shi Y Y, Wu J H. Structural basis of protein-protein interaction studied by NMR. *J Struct Funct Genomics*, 2007, 8: 67—72[[doi](#)]
- 10 施蕴渝, 吴季辉. 核磁共振波谱研究蛋白质三维结构及功能. *中国科学技术大学学报*, 2008, 38: 941—949
- 11 Liu J X, Zhang J H, Yang Y S, et al. Conformational change upon ligand binding and dynamics of the PDZ domain from leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor. *Protein Sci*, 2008, 17(6): 1003—1014[[doi](#)]
- 12 Kourlas P J, Strout M P, Becknell B, et al. Identification of a gene at 11q23 encoding a guanine nucleotide exchange factor: evidence for its fusion with MLL in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 2145—2150[[doi](#)]
- 13 Kristelly R, Gao G, Tesmer J J. Structural determinants of RhoA binding and nucleotide exchange in leukemia-associated Rho guanine-nucleotide exchange factor. *J Biol Chem*, 2004, 279: 47352—47362[[doi](#)]
- 14 Aurandt J, Vikis H G, Gutkind J S, et al. The semaphorin receptor plexin-B1 signals through a direct interaction with the Rho-specific

- nucleotide exchange factor, LARG. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 12085—12090[[doi](#)]
- 15 Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, et al. Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. Cell, 1999, 99: 71—80[[doi](#)]
- 16 Xu C, Zhang J H, Huang X J, et al. Solution structure of human peptidyl prolyl isomerase like protein 1 and insights into its interaction with SKIP. J Biol Chem, 2006, 281(23): 15900—15908[[doi](#)]
- 

## Protein interaction and change of protein conformation and dynamics

Shi YunYu & Wu JiHui

Hefei National Laboratory for Physical Sciences at Microscale, School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China

**Understanding protein interaction from the view of structural biology is important for understanding protein function in the cell. Nuclear magnetic resonance (NMR) is an important method in structural biology. To investigate molecular interactions by NMR spectroscopy is generally at a close physiological condition. This method particularly suits for studying transient dynamical complexes. NMR belongs to few techniques which can provide information for the unstructured or partial structured proteins. NMR also can provide information of protein dynamics in multiple-time scales. Here, we give some examples which come from research in our laboratory to illustrate the importance of NMR.**

protein, interaction, nuclear magnetic resonance, protein dynamic complex, protein dynamics, intrinsic unstructured protein