

【研究简报】

Q156A 天花粉蛋白的晶体结构研究

董贻诚^① 朱曰荣^① 陈世芝^① 李建辉^① 邵鹏柱^②

(①中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; ②香港中文大学生物化学系)

关键词 突变体 晶体结构 天花粉蛋白

核糖体失活蛋白(RIPs)是一类具有 RNA N-糖苷酶活性的毒蛋白, 它水解真核细胞 28SrRNA 第 4324 位腺苷酸的 N-糖苷键, 释放出一个腺嘌呤碱基, 使核糖体失活^[1]. 天花粉蛋白(TCS)是单链核糖体失活蛋白的重要代表. 我们早已报道了天花粉蛋白 0.173 nm 分辨率的晶体结构^[2]. 关于天花粉蛋白结构与功能关系的深入研究, 已经发表了天花粉蛋白与底物类似物的复合物晶体结构^[3,4]. 我们还对一些保守残基的突变体进行了研究^[5,6], 其中 R22L TCS 和 Y14F TCS 的晶体结构已经测定, Arg22 和 Tyr14 是位于活性口袋外, 但与活性口袋又有密切联系的保守残基, 其侧链形成的氢键也十分保守. 在 TCS 晶体结构中还有一类保守残基形成的氢(盐)键也是十分保守的, 它们是处于活性口袋之内的残基形成的, 如 Q156 的 NH₂ 与 E189 的 OE2, Y111 的 OH 与 E160 的 OE2, R122 的 NH₂ 与 E189 的 OE1 等. 为了探讨活性口袋内这些保守氢键对活性部位构象和活性的影响, 我们用基因定位突变方法, 把保守残基突变成非极性残基, 使保守氢(盐)键消失, 然后测定这些突变体的晶体结构, 观察突变体分子的构象变化, 探讨构象改变与活性变化的关系. 这里报道的是 Q156A TCS 的晶体结构.

1 实验

(1) 晶体生长. Q156A TCS 的表达和纯化方法见前述^[5]. 晶体生长采用气相扩散法, 蛋白浓度为 10 mg/mL, 缓冲液为 pH4.6 的醋酸缓冲液, 内含 10%~15% KCl 和 20% PEG4000. 将蛋白溶液与缓冲液 1:1 混合后对该缓冲液气相扩散, 一个月后得合用的大单晶, 大小可达

- 3 Skeik-bahae Mansoor, Said Ali A, Wei T H, et al. Sensitive measurement of optical nonlinearities using a single beam. IEEE J Quantum Electron, 1990, 26(4): 760
- 4 Marusik L A, Messier R, White W B, et al. Optical absorption spectrum of hematite, $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ near IR to UV. J Phys Chem Sol, 1980, 41: 981
- 5 杨迈之, 李会铭, 蔡生民, 等. 氧化铁超微粒的光电化学特性, 物理化学学报, 1994, 10(4): 376
- 6 Iturbe-Castillo M D, Sanchez-Mondragon J J, Stepanov S I, et al. Peculiarities of Z-scan technique in liquids with thermal non-linearity (steady state regime). Optik, 1995, 100(2): 49
- 7 Cheng Y M, Gayen S K. Optical nonlinearities of tea studied by Z-scan and four-wave mixing techniques. J Opt Soc Am, 1994, B11(4): 636
- 8 Ricard D, Roussignol Ph, Flytzanis Chr, et al. Surface-mediated enhancement of optical phase conjugation in metal colloids. Opt Lett, 1985, 10(10): 511
- 9 Neeves A E, Birnboim M H. Composite structures for the enhancement of nonlinear optical materials. Opt Lett, 1988, 13(12): 1087
- 10 Fei H S, Ai X C, Gao M Y, et al. Luminescence of coated $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles. J Lumin, 1996, 66&67: 345

(1996-11-05 收稿)

0.5 mm×0.4 mm×0.3 mm. 该晶体属正交晶系, 空间群 $P2_12_12_1$, 晶胞参数 $a = 3.840$ nm, $b = 7.645$ nm, $c = 7.926$ nm, 与天然天花粉蛋白晶体同晶度很好.

(2) 数据收集和处理. 在北京大学物理化学研究所 R-AXIS II 面探测器系统收集了一套 0.20 nm 的数据, 共收集了 36 幅画面, 每幅画面旋转 2.5° , 曝光时间 30 min, 36 幅画面共收集衍射点 48 828 个, 数据经该系统的处理软件(版本 2)处理后, 0.20 nm 内独立的可观察到的衍射点 13 072 个($I > 2\sigma(I)$), 等效点归并 R 因子 4.45%, 整套数据的完全度为 79.6%.

2 结果

2.1 结构测定及精化

结构用同晶差值 Fourier 法解得. Q156A TCS 突变体的初始模型是将 0.173 nm 分辨率的 TCS 坐标中第 156 位的 Gln 略去, 然后计算了 $|F_o| - |F_c|$ 和 $2|F_o| - |F_c|$ 的差值电子密度图(图 1). 从图 1 可明显看出第 156 位侧链只有一个 $C\beta$ 原子的电子密度, 说明第 156 位 Gln 确实已替换成 Ala 了. 结构修正用 X-PLOR 程序包, 模型调整用 FRODO 程序包. Q156A TCS 初始模型算得的 R 因子为 0.32. 开始一轮用 120 步能量优化及 30 步限制性温度因子修正, 此时采用了较大的 W_a 值, 加强晶体学制约因子的权重, 放松对立体化学的制约, 使原子坐标能有较大的移动余地. R 因子下降到 0.202, 但键长键角偏差较大, 分别为 0.003 9 nm 和 4.828° , 此时在差值电子密度图上发现 156 位附近有两个较明显的球形密度, 恰好可以放入两个水分子. 再一轮模拟退火修正后, 在差值电子密度图上显示 156 位附近有第 3 个水分子, 然后在电子密度图上对吻合不好的残基进行调整, 并加入 113 个水分子, 经 80 步能量优化及 30 步温度因子修正后 R 因子降到 0.188. 再在差值电子密度图上对个别残基侧链进行调整, 同时加入新的水分子. 进一步修正后最后 R 因子降到 0.175, 键长键角的均方根偏差分别为 0.001 2 nm 和 2.633° .

2.2 结构描述

Q156A TCS 分子的整体结构没有大的变化, Q156A 突变体和母体 TCS 的主链叠合偏差 rms 仅 0.031 nm, 构象变化最大的是 C 末端最后 3 个残基. 活性口袋区的构象没有发生明显的变化, 与活性口袋区有关的几段肽段(残基 69-71, 109-111, 122, 155-163, 189-193)的主链原子突变前后叠合偏差 0.025 7 nm. 但在突变点附近的氢键体系发生了明显的变化, 在 TCS 中 Q156 侧链原来与 E189 的侧链和 M152 的主链 O 有氢键的相互作用, 当 Q156 突变成 A156 后, 这些氢键自然就消失了, 但是由于 Ala 的侧链体积较 Gln 的侧链体积小, 突变后 A156 周围会造成空隙. 晶体结构测定表明在 A156 周围有 3 个水分子出现, 其中一个水分子在原来母

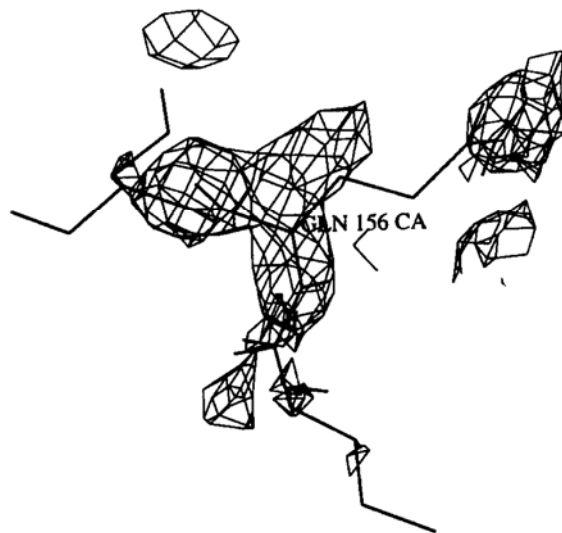


图 1 TCS 模型与略去 156 位残基原子坐标所得 $|F_o| - |F_c|$ 差值电子密度图

体 TCS 结构中就存在, 而另 2 个水分子是在母体 TCS 中所没有的, 这两个水分子填补了突变后的空隙, 它们之间本身还有氢键联系, 而每个水分子又分别与 E189 的侧链和 M152 主链 O 有氢键相互作用, 恰好替代了原来 Gln 侧链的酰胺基团的作用(见图 2)。

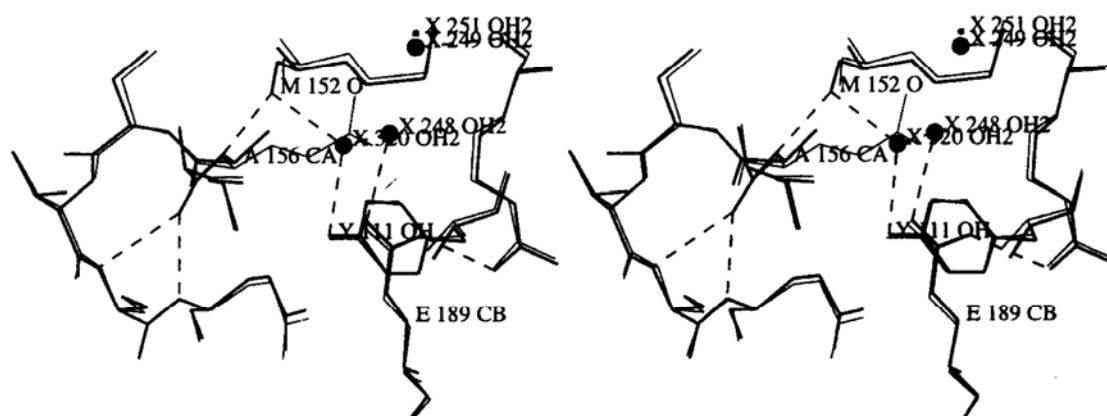


图 2 新填充的水分子形成的氢键与 TCS 的比较
粗线为 Q156A, 细线为 TCS, 大球为 Q156A 水分子, 小球为 TCS 水分子

3 讨论

在 TCS 中 Q156 位处于 $\alpha 5$ 螺旋内, 此段 α 螺旋在天花粉蛋白分子结构中处于最内埋的位置, 它主要是由疏水残基和一些小侧链的残基组成的, 螺旋表面没有明显的两亲性. 因此, 从亲水的 Q156 突变成疏水的 A156 后, α 螺旋构象没有发生大的改变, 突变前后该螺旋的主链叠合偏差是 0.020 2 nm 也说明了这一点. 这就保证了分子整体拓扑结构不会发生大的改变.

Gln 突变成 Ala 后, 显然 Gln 侧链形成的氢键消失了, 但是由于两个水分子占据了突变后留下的空隙, 并且形成了活性口袋区新的氢键网络(见图 2), 从而使活性口袋区构象基本保持不变.

虽然活性口袋区主链构象没有大的改变, 但是活性口袋区内 Tyr70 的侧链构象变化却十分显著. 突变体中 Tyr70 与母体中的 Tyr70 比较, 它绕 $C_\beta-C_\gamma$ 轴旋转了约 45° , 并且也有一些位移. 在母体中 Tyr70 没有和其他残基或任何水分子有氢键相互作用, 且它的侧链原子的温度因子都较高, 说明 Tyr70 侧链的自由转动柔性较大. 这一点在 TCS 底物类似物的复合物晶体结构上也有反映. 在这些结构中, Tyr70 侧链的取向都有所不同, 而且它们的温度因子都较大, 推测 Tyr70 侧链的自由旋转可能在底物识别过程中起着某种作用. 但在 Q156A TCS 突变体中 Tyr70 的微环境与上述几个结构中有所不同, 它的酚羟基与一个水分子有氢键相互作用, 而这一水分子又通过和其他水分子的氢键网络与 Glu189 的主链氧原子和 Ser193 的主链氮原子相联系, 这就限制了 Tyr70 侧链的自由转动, 使得它的侧链原子温度因子就比较小, 或许这就是它和底物结合亲和力稍大^[5]一些的原因.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号:39680003)资助项目, 香港部分工作由香港研究基

【研究简报】

Y14F 天花粉蛋白的晶体结构研究

吴伸^① 阎军^① 姚宏兵^① 邵鹏柱^② 董贻诚^①

(①中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; ②香港中文大学生物化学系)

关键词 天花粉蛋白 突变体 晶体结构

核糖体失活蛋白(Ribosome inactivating protein, RIP)是广泛存在于植物界的蛋白毒素^[1], 天花粉蛋白(Trichosanthin, TCS)又是该家族中的一个重要成员^[2]. TCS及其同源蛋白的高分辨率晶体结构^[3,4]为进行结构与功能关系的研究打下了良好的基础, 通过对同源蛋白的结构比较发现在结构中存在很保守的氢键. 为了探讨这些保守氢键对结构与功能的影响, 我们用基因定位突变的方法, 对形成保守氢键的残基进行突变, 测定这些突变体的活性与晶体结构, 可以加深我们对这些保守氢键所起作用的认识. TCS中 Tyr14的羟基与 Ser157的主链氧之间形成保守氢键, 这一氢键在螺旋 $\alpha 5$ 的弯折处, 而且 Ser157的主链羰基氧明显偏离了正常螺旋中的与螺旋轴平行的方向, 这一现象在已知的 RIPs 结构中都存在. 为了考察这一保守氢键对螺旋 $\alpha 5$ 弯折的形成所起的作用, 我们将 Tyr14突变为 Phe, 这样突变后将保留芳香环侧链的特性, 突变后的构象变化主要来自这一保守氢键的消失, 以便于考察这一保守氢键对螺旋 $\alpha 5$ 弯折的影响.

1 实验

(1)晶体生长. 参考王家槐^[5]等人培养 TCS 晶体的条件, 用坐滴汽相扩散法得到适于 X 射线衍射用的单晶. 晶体属正交晶系, $P2_12_12_1$ 空间群. 其晶胞参数为: $a = 3.834$, $b = 7.710$, $c = 7.950$ nm, 突变体和野生型的晶体同晶度很好.

(2)数据收集与处理. 数据的采集在 Mar Research 面探测器系统上完成, 分辨率为

金委员会(CUHK11/91)基金资助.

参 考 文 献

- 1 Endo Y, Tsurugi K. RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain; mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosome. *J Biol Chem*, 1987, 262: 8 128~8 130
- 2 高 奔, 马星奇, 王耀萍, 等. 天花粉蛋白 1.73 Å 分辨率结构测定及其精化. *中国科学, B 辑*, 1993, 23(3): 272~282
- 3 杨 洁, 吴 伸, 董贻诚. 天花粉蛋白与 FMP 复合物的晶体结构. *生物物理学报*, 1994, 10(4): 537~542
- 4 Xiong Jianping, Xia Zongxing, Wang Yu. Crystal structure of trichosanthin-NADPH complex at 1.7 Å resolution reveals active-site architecture. *Nature Structural Biology*, 1994, 1(10): 695~700
- 5 Wong Kambo, Ke Yibao, Dong Yicheng, et al. Structure/function relationship study of Gln156, Glu160 and Glu189 in the active site of trichosanthin. *Eur J Biochem*, 1994, 221(2): 787~791
- 6 徐琼芳, 麻孙恺, 陈华伦, 等. 天花粉蛋白基因定点突变及其表达活性的研究. *中国科学, B 辑*, 1995, 25(12): 1 279~1 284

(1997-03-19 收稿, 1997-05-13 收修改稿)