

枯草菌 HemAT 蛋白质结合配基 O₂ 的构象变化 ——紫外共振拉曼光谱研究

顾玉宗¹, 张放¹, 皇甫昱², 王超¹, 毛艳丽¹

(1. 河南大学微系统物理研究所, 河南开封 475001; 2. 商丘职业技术学院, 河南商丘 476000)

摘要: 枯草菌 HemAT 蛋白质是新近发现的一种基于血红素的趋氧性同型二聚体蛋白质。作者对此蛋白质进行了表达和提纯。用紫外共振拉曼光谱研究了全分子和传感域 HemAT 在与配基 O₂ 结合时的构象变化。发现 O₂ 配基与 HemAT 蛋白质的结合使传感域中 Trp 和 Tyr 的环境发生变化, 而对连接域中 Tyr 的环境影响可忽略不计。信号发送域对 O₂ 配基引起的 Trp 和 Tyr 的环境变化不产生影响。O₂ 配基与 HemAT 蛋白质的结合使得 G-螺旋发生位移, 传感域与信号发送域通过某种互感方式把 O₂ 结合信号从传感域传递到信号发送域。

关键词: 枯草菌; HemAT; 蛋白质; 紫外共振拉曼

中图分类号: O657.37; Q518.4

0 引言

枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 中 HemAT (Heme-based Aerotactic Transducer) 蛋白质是新近发现的一种基于血红素的趋氧性蛋白质。它是一种同型二聚体 (homodimer) 蛋白质, 其中每个单体都由一个传感域 (sensor domain) 和一个信号发送域 (signaling domain) 组成, 传感域是包含一个血红素的球蛋白折叠, 其中的血红素担当氧分子 O₂ 结合位置的角色, 在自然状态下极易结合 O₂。信号发送域的作用是把传感域检测到 O₂ 分子的信号传送给周围的调节蛋白质 (regulatory protein), 从而控制鞭毛的 (flagellar) 旋转方向^[1]。HemAT 蛋白质因此被称为氧气传感器蛋白质 (oxygen sensor protein)。

HemAT 蛋白质是一种可溶性蛋白质, 它的发现为人们提供了一个独特的机会, 更加深入细致地研究趋氧性问题中信号传送的分子机制^[2,3]。然而, 目前的有关报道尚未给出清晰的信号传送分子机制的图像。拉曼光谱在研究蛋白质方面已有很多应用。共振拉曼光谱 (RR) 是一个监控蛋白质中发色团分子结构的有力工具^[4], 特别是紫外共振拉曼光谱 (UVRR) 对监控蛋白质结构变化非常有效^[5]。在 220~250 nm 波长的激光激发下, 酪氨酸 (Tyr) 和色氨酸 (Trp) 残基侧链的振动强度被选择性地增强, Tyr 和 Trp 残基的 UVRR 谱带不仅反映它们的疏水/亲水环境情况, 而且还反映氢键的形成与

否。另外, 由于氧分子 O₂ 束缚到血红素上是 HemAT 蛋白质氧敏的关键的第一步, 因此, 本文应用 UVRR, 通过 Tyr 和 Trp 谱带的变化来探测 HemAT 蛋白质在与氧配基结合后所产生的构象变化。

1 材料和方法

1.1 HemAT 蛋白质的表达与纯化

实验用的 HemAT 蛋白质在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的表达方法与文献^[2,6]中的方法类似。纯化制备枯草菌的染色体 DNA, 以其为模板, 通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增 HemAT 基因。对于 HemAT 蛋白质的表达, 将大肠杆菌细胞在含有卡那霉素 (30 μg/mL) 的 TB (Terrific Broth) 培养基内培养 (37°C) 4 h 后, 加入 IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) 诱导剂, 在 18°C 下继续培养 18 h。然后利用离心机 (7 000 r/min) 收菌, 储藏在 -80°C 的冰箱内直到使用。

将上述收得的细胞从 -80°C 的冷藏冰箱内取出, 放入 4°C 室内解冻成膏状, 然后移入不锈钢的杯中, 再加入缓冲液 A (50 mmol/L Tris-HCl+15 mmol/L glycine+1 mol/L NaCl (pH 8.0)) 到不

收稿日期: 2007-03-23

通讯作者: 顾玉宗, 电话: (0378)3881602

E-mail: guyuzong@yahoo.com.cn

锈钢杯中悬浮并搅拌 30 min。将不锈钢杯埋入冰盒中露出杯口，用超声机对杯内悬浮液中的细胞进行破碎。将超声破碎后的悬浮液以 40 000 r/min 的离心速度在离心腔 4℃ 的离心机内进行 30 min 离心分离，然后将分离后的上清液在 4℃ 室内用 0.47 μ 的过滤器过滤。以后的过程均在 4℃ 室内进行。在计算机控制的纯化机器 (ÄKTA FPLC, Amersham Biosciences K.K.) 上先用缓冲液 A 对 Ni²⁺ HiTrap 螯合柱 (Amersham Biosciences Corp.) 进行清洗平衡，再用 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 将 HemAT 蛋白质吸附在 Ni²⁺ HiTrap 螯合柱上。用 50 mmol/L Tris-HCl+100 mmol/L 咪唑缓冲液洗提。将 Ni²⁺ HiTrap 螯合柱更换成 HiTrap Q HP 离子交换柱 (Amersham Biosciences Corp.)，装载前步洗提出的蛋白质液体，用 50 mmol/L Tris-HCl+100 mmol/L NaCl (pH 8.0) 缓冲液对 HiTrap Q HP 离子交换柱清洗平衡，然后随着 NaCl 浓度的线性增加，纯化的 HemAT 蛋白质即从 HiTrap Q HP 离子交换柱中被洗提出来。

为了拉曼测量，我们将纯化后的 HemAT 蛋白质溶液的 pH 8.0 调整为 pH 7.5，浓度调整为 80 μ mol/L。方法如下：将 pH 8.0 的 HemAT 溶液注入到分子筛离心柱中，再注入适量 pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液，然后将盛有 HemAT 溶液分子筛离心柱在 4℃ 的离心机中以 4 000 r/min 速度离心 20 min，除去离心出的缓冲液，再注入适量 pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液继续离心，这样重复四次，最后就得到 pH 7.5 的 HemAT 溶液，再加入适量的 Tris-HCl 缓冲液调至 80 μ mol/L 浓度 (用凝胶过滤色谱法确定的 HemAT 分子质量约为 188 kDa)。

全分子 HemAT 蛋白质和传感域 HemAT 蛋白质均采用上述同样的方法获得。

1.2 紫外共振拉曼 (UVRR) 测量

UVRR 的测量系统在文献[7]中有较详细的描述。UV 激发光源 229 nm 来自腔内倍频的 Ar⁺ 离子激光器 (Coherent, Innova 300Fred)。用 Pellin-Broca 棱镜将产生的二次谐波与基频光波分开，并聚焦到蛋白质溶液样品上。样品池连接在一个旋转的电机上，密封的旋转样品池是用石英制成的直径为 5 mm、高度为 5 mm 的圆柱体。样品池中放入 150 μ l 蛋白质溶液，并放入一个聚四氟乙烯包覆的微形磁柱，样品池外靠近样品池处放置一固定不动

的磁体，测量过程中随着样品池的旋转，样品池中的微形磁柱对蛋白质溶液具有搅拌功能。直角拉曼散射光用 UV 显微物镜收集后，进入一个装有 3600 槽/mm 全息光栅的 126 cm 单色仪散开，由增强电耦合探测器 (ICCD, Princeton Instruments, ICCD-1024MG-E/1) 探测，传送至计算机程序处理。光谱分辨率为 7.8 cm⁻¹。入射到样品上的激光功率为 0.3 mW。每 10 min 更换一次蛋白质样品，以保证样品新鲜。得到一个拉曼光谱所用的总曝光时间约为 1 h。对每次更换下来的样品进行吸收谱测量，并与 UVRR 测量前的吸收谱进行比较，以确保在 UVRR 测量中没有变性沉积出现。如果发现 UVRR 测量前后的吸收光谱有变化，则放弃该次拉曼光谱。实验发现，在上述实验条件下，没有变性沉积现象的发生。所得到的拉曼光谱以环己胺和三氯乙烯的拉曼光谱特征峰为标准进行校准。

2 结果与讨论

图 1 所示为全分子 (full-length) 和传感域 (sensor domain) 枯草菌 HemAT 蛋白质在波长 229 nm 的激光激发下所得到的 UVRR 光谱，(1) 为全分子 HemAT 蛋白质结合 O₂ 分子后的拉曼光谱；(2) 为 O₂ 分子脱离还原后全分子 HemAT 蛋白质的拉曼光谱；(3) 为传感域 HemAT 蛋白质结合 O₂ 分子后的拉曼光谱；(4) 为还原后传感域 HemAT 蛋白质的拉曼光谱；(5) 为全分子 HemAT 蛋白质结合 O₂ 分子后的拉曼光谱与还原后的拉曼光谱之差，即(1)-(2)；(6) 为传感域 HemAT 蛋白质结合 O₂ 分子后的拉曼光谱与还原后的拉曼光谱之差，即(3)-(4)；(7) 为双差，即(5)-(6)。全分子 HemAT 和传感域 HemAT 由于具有趋氧性，则在自然状态下均为结合有 O₂ 分子的状态，它们的还原状态通过下面的方法获得：在真空系统下，将用橡胶盖密封的、注有 150 μ l 样品的样品池内上部的气体抽成真空，从真空系统上取下样品池，然后用注射器注入定量的连二亚硫酸钠溶液 (连二亚硫酸钠溶液也是在真空系统下配制的，其溶液浓度为 65 g/L)，再将样品池上下颠倒两三次使连二亚硫酸钠均匀分散在样品中，通过比较注入连二亚硫酸盐前后样品的吸收光谱，确定样品是否为还原态。图 2 为样品结合 O₂ 分子时的吸收谱以及还原后的吸收谱。

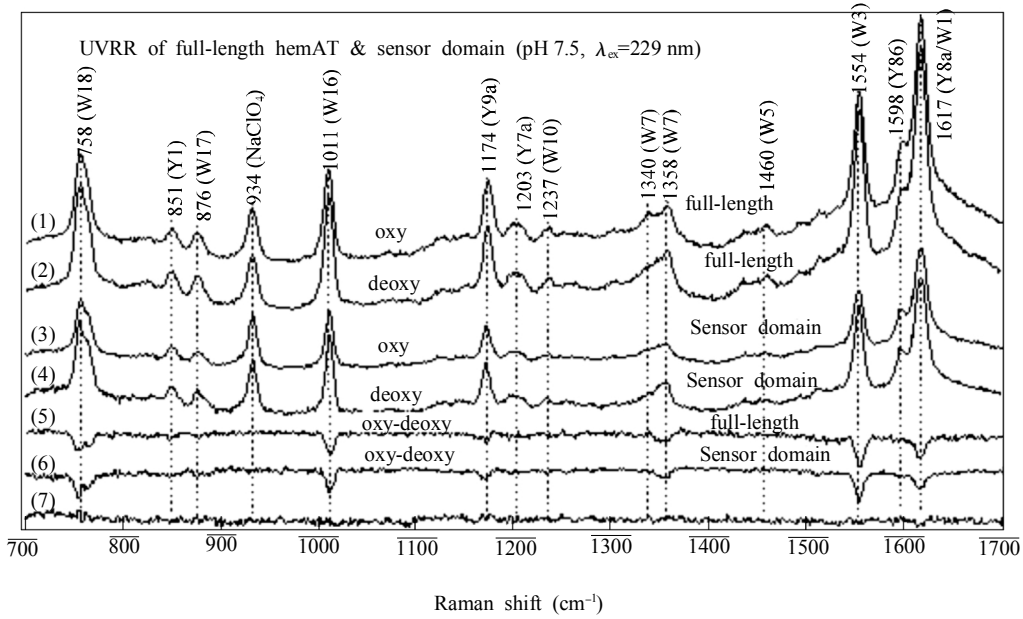


Fig.1 The 229 nm excited UVRR spectra of oxy and deoxy full-length HemAT (1), (2) and their difference (5)=(1)-(2); the spectra of oxy and deoxy HemAT sensor domain (3), (4) and their difference (6)=(3)-(4); (7)=(5)-(6)

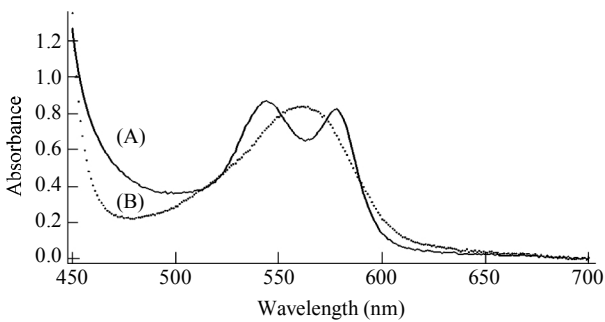


Fig.2 Absorption spectra of oxy (A) and deoxy (B) of full-length HemAT. Sensor domain HemAT has the similar absorption spectra

图 3 为枯草菌 HemAT 单体示意图，其中传感域残基数为 1~175，其中含有 5 个酪氨酸 Tyr13、Tyr49、Tyr70、Tyr133、Tyr148 和一个色氨酸 Trp132。信号发送域残基数为 198~432，其中不含酪氨酸和色氨酸。其余残基数 176~197 为传感域

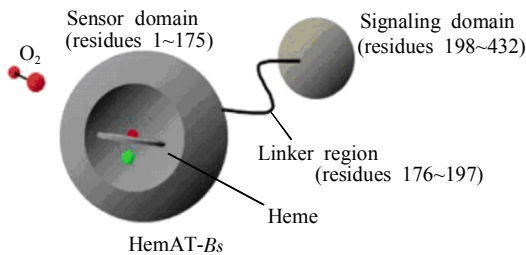


Fig.3 Sketch of HemAT-Bs

与信号发送域之间的连接部分，其中含有一个酪氨酸 Tyr184。因此，标准全分子 HemAT 与传感域相比，多了一个酪氨酸 Tyr184。

酪氨酸 Tyr13、Tyr49、Tyr70、Tyr133、Tyr148 和色氨酸 Trp132 在 HemAT 传感域结构中的分布如图 4 所示。

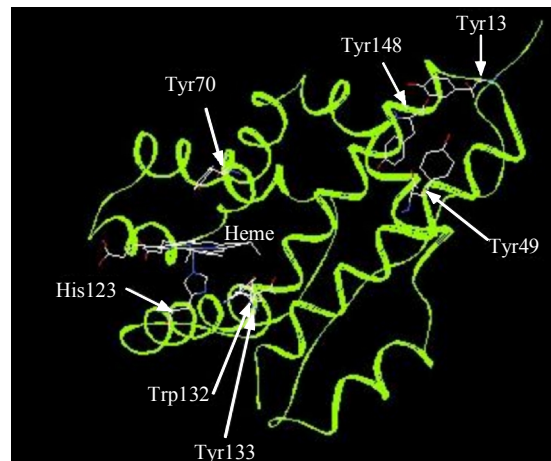


Fig.4 Diagram of HemAT sensor domain. The protein is drawn as ribbons and residues Tyr13, Tyr49, Tyr70, Tyr133, Tyr148, His123, Trp132, heme group and ligand are represented as ball/stick models

229 nm 的激发主要增强色氨酸 Trp 和酪氨酸 Tyr 残基的振动，因此，图 1(1)中的谱带主要来自

一个色氨酸 Trp132 和 6 个酪氨酸 Tyr13、Tyr49、Tyr70、Tyr133、Tyr148、Tyr184 残基, 分别以 W 和 Y 来标注色氨酸和酪氨酸产生的谱带, 其后跟随对应的俗成模式数^[8]。观察到的 Trp 谱带分别为 1617 cm^{-1} (W1 和 Y8a 交迭), 1554 cm^{-1} (W3), 1460 cm^{-1} (W5), $1358\sim 1340\text{ cm}^{-1}$ (W7 Trp doublet), 1237 cm^{-1} (W10), 1011 cm^{-1} (W16), 876 cm^{-1} (W17) 和 758 cm^{-1} (W18)。Tyr 谱带分别为 1617 cm^{-1} (Y8a), 1598 cm^{-1} (Y8b), 1203 cm^{-1} (Y7a), 1174 cm^{-1} (Y9a) 和 851 cm^{-1} (Y1)。ClO₄⁻ (934 cm^{-1}) 为内部强度参照物 NaClO₄ 的谱带, 以此作为强度参考标准。由于都包含唯一的 Trp132, 所以全分子(1)和传感域(3)的 Trp 拉曼谱带具有相似的强度和频率。另一方面, 由于传感域中不含有 Tyr184, 所以传感域(3)的 Tyr 谱带强度低于全分子(1)的 Tyr 谱带强度。

频带 W17 (876 cm^{-1}), 它作为 Trp 吡啉环的氢键结合标志, 表明在溶液中形成了中强度的氢键^[8,9]。Trp 的频率 W3 模对连接吡啉环键 (C_β-C₃) 与肽主链转动角的绝对值 $|\chi^{21}|$ 敏感。图 1 中 W3 模的峰值为 1554 cm^{-1} , 对应的 $|\chi^{21}|$ 角为 102° 。差谱(5)和(6)都在 758 cm^{-1} (W8)、 1011 cm^{-1} (W16)、 1358 cm^{-1} (W7)、 1554 cm^{-1} (W3) 和 1617 cm^{-1} (W1/Y8a) 处表现为明显负值, 这表明无论是全分子的还是传感域的 HemAT, 在 O₂ 分子被束缚的形式下, Trp 和 Tyr 谱带的强度都减弱。另外, 差谱中 Y9a 处显示, 由于 O₂ 分子被束缚导致了该处的频率发生了小的上移现象。从双差谱(7)可以清楚地看出, (5)和(6)之差几乎没有峰值出现, 表明束缚 O₂ 引起的全分子 HemAT 中和传感域中的 Trp 和 Tyr 残基的环境变化几乎是一样的。亦表明, 尽管全分子 HemAT 是由传感域通过连接区 (176~197) 与信号发送域相连接, 但信号发送域对因 O₂ 引起的 Trp 和 Tyr 残基的环境变化几乎不产生影响。

枯草菌 HemAT 蛋白质中只有一个 Trp 残基 Trp132, 它位于血红素最近边的 G-螺旋内^[9]。利用溶液的 UVRR, 这个残基可以用来探测与配基结合时蛋白质三级结构的构象变化。本文中 UVRR 结果显示 Trp132 的谱带在 HemAT 处于 O₂ 束缚状态时强度变弱。我们知道, Trp 谱带对 Trp 侧链的环境疏水性和 / 或者氢键结合反应敏感^[8], 如果氢键发生变化, 谱带强度和频率都会发生变化, 而疏水性的改变, 将导致谱带强度的改变。由于在 O₂

束缚状态氢键标志带 (876 cm^{-1}) 的谱峰位置没有移动, 所以 Trp132 与附近残基或水分子之间的氢键未发生变化。但 Trp132 谱带强度在束缚 O₂ 的情况下变弱, 表明 Trp132 的环境发生了变化。由于 W7 的双峰强度比值 I1360/I1340 是衡量一个 Trp 残基环境亲水性的量^[9], 通过拟合可以求出此值, 比值小于 1 为亲水性, 比值大于 1 为疏水性; 另一方面, 根据该比值的变化情况也可判断出亲水性 / 疏水性的变化趋势, 若比值减小, 则亲水性增强, 疏水性减弱, 反之则亲水性减弱, 疏水性增强。从图 1 中的差谱(5)和(6)可以看出, I1358 的强度因 O₂ 而减弱, I1340 几乎不变。因此, 比值 I1358/I1340 也因 O₂ 而减小。由此可以得到 Trp132 的周围环境疏水性减弱, 亲水性增强。我们在对 Tyr133 作突变实验时也发现了 G-螺旋中 Tyr133 周围环境因束缚配基 O₂ 而变得亲水性增强, 疏水性减弱。传感域的晶体结构表示, 在无配基到有氰化物配基时, G-螺旋发生了位移^[9]。这与我们的 UVRR 发现是一致的, 即全分子 HemAT 的 G-螺旋中 Trp132 和 Tyr133 的附近区域, 由于蛋白质中血红素对配基 O₂ 的束缚, 亲水性增强, 疏水性减弱。G-螺旋的位移方式无疑对信号的传递方式起着重要的作用。

全分子和传感域 HemAT 在束缚 O₂ 时具有相同的 Trp 和 Tyr UVRR 强度改变, 这些结果表明, 信号发送域对 Trp 和 Tyr 因蛋白质束缚 O₂ 产生的环境变化没有影响。全分子 HemAT 比其传感域多一个 Tyr184 (位于残基数 176~197 之间的传感域与信号发送域的连接部分), 而 O₂ 引起的 Trp 和 Tyr UVRR 的变化对全分子和传感域 HemAT 而言基本上是相同的, 这说明 O₂ 对 Tyr184 的环境未产生实际的变化或者变化可以忽略不计。这个结果让人感到惊奇, 因为按照预料, 传感域因 O₂ 产生的构象变化似乎应该通过连接区域通讯到信号发送域。因此我们推想, O₂ 引起的传感域的构象变化是通过传感域与信号发送域之间的某种互感作用传播至信号发送域的。

3 结 论

枯草菌中的 HemAT 蛋白质中的血红素在与配基 O₂ 结合后, 处在传感域中的 Trp 和 Tyr 的周围环境发生变化, Trp132 和 Tyr133 的周围环境变向更强的亲水性, 它们所在的 G-螺旋发生位移, 信

号发送域对 Tyr 和 Trp 的周围环境因 O₂ 产生的变化不产生影响, O₂ 对连接区域中的 Tyr184 的环境所产生的影响可忽略不计, 传感域向信号发送域传递 O₂ 被束缚的信号方式可能是通过两域之间的某种互感作用, 并非通过连接部分的位移方式。

参考文献:

- [1] Hou S, Larsen RW, Boudko D, Riley CW, Karatan E, Zimmer M, Ordal GW, Alam M. Myoglobin-like aerotaxis transducers in archaea and bacteria. *Nature*, 2000,403:540~544
- [2] Aono S, Kato T, Matsuki M, Nakajima H, Ohta T, Uchida T, Kitagawa T. Resonance Raman and ligand binding studies of the oxygen-sensing signal transducer protein HemAT from *Bacillus subtilis*. *J Bio Chem*, 2002,277:13528~13538
- [3] Zhang W, Phillips GN. Structure of the oxygen sensor in *Bacillus subtilis*: signal transduction of chemotaxis by control of symmetry. *Structure*, 2003,11:1097~1110
- [4] Kitagawa T. Biological applications of Raman spectroscopy. In: Spiro TG, Ed. Biological application of Raman spectroscopy. New York: John Wiley & Sons, 1988, Vol.III : 97~131
- [5] Austin JC, Rodgers KR, Spiro TG. Protein structure from ultraviolet resonance. Raman spectroscopy. In: Riordan JF, Vallee BL, Eds. Method in enzymology. San Diego, CA: Academic Press, 1993,226:374~396
- [6] Aono S, Nakajima H, Ohta T, Kitagawa T. Resonance Raman and ligand-binding analysis of the oxygen-sensing signal transducer protein HemAT from *Bacillus subtilis*. *Methods in enzymology*, 2004,381:618~628
- [7] Haruta N, Aki M, Ozaki S, Watanabe Y, Kitagawa T. Protein conformation change of myoglobin upon ligand binding probed by ultraviolet resonance Raman spectroscopy. *Biochemistry*, 2001,40:6956~6963
- [8] Harada I, Takeuchi H. Advance in spectroscopy of biological systems. In: Clark RJH, Hester RE, Eds. New York: John Wiley & Sons, 1986. 113~175
- [9] Miura T, Takeuchi H, Harada I. Characterization of individual tryptophan side chains in proteins using Raman spectroscopy and hydrogen-deuterium exchange kinetics. *Biochemistry*, 1988,27(1):88~94

CONFORMATIONAL CHANGES OF HemAT PROTEIN FROM *Bacillus subtilis* UPON O₂ BINDING STUDIED BY UVRR

GU Yu-zong¹, ZHANG Fang¹, HUANGPU Yu², Wang Chao¹, MAO Yan-li¹

(1. Institute of Microsystem Physics, Henan University, Kaifeng 475001, Henan, China; 2. Shangqiu Vocational and Technical College, Shangqiu 476000, Henan, China)

Abstract: HemAT protein from *Bacillus subtilis* is a newly discovered heme-based aerotactic homodimer protein. Full-length and truncated sensor domain HemAT samples for experiment were expressed and purified. Their conformational changes upon O₂ ligand binding have been studied by ultraviolet resonance Raman spectroscopy. It is found that O₂ binding to the heme of HemAT changes the environment of the Trp and Tyr in the sensor domain but hardly changes the environment of the Tyr in the linker region between the sensor domain and the signaling domain. In addition, the signaling domain does not affect the Trp and Tyr residues environments upon O₂ binding. G-helix experiences displacement in going from unliganded to O₂ ligand form. It is suggested that the conformational changes that occur in the sensor domain upon O₂ binding be propagated to the signaling domain through interactions between sensor and signaling domains.

Key Words: *Bacillus subtilis*; HemAT; Protein; UVRR

Received: Mar 23, 2007

Corresponding author: GU Yu-zong, Tel: +86(378)3881602, E-mail: guyuzong@yahoo.com.cn