

研究论文

金黄色葡萄球菌核酸酶 C 末端去 9 肽 对酶蛋白溶液构象的影响

徐立东, 童宇峰, 王金凤

(中国科学院生物物理所, 分子生物学研究中心, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要: 通过多维异核磁共振方法, 结合运用荧光和圆二色等光谱方法, 比较研究了 V8 菌株金黄色葡萄球菌核酸酶(含 149 个氨基酸残基), 酶蛋白 1~140 片段 (SNase140) 以及在 TMP (thymidine 5'-monophosphate) 和 Ca^{2+} 存在下的 SNase140 的溶液构象状态。探讨了酶蛋白 C 末端去 9 肽后对酶蛋白构象和活力的影响。研究指出, 远离酶蛋白活性部位残基间相互作用的变化, 将通过酶蛋白两个亚结构域之间所形成的氢键, 影响酶蛋白活性部位的空间构象, 从而影响酶蛋白的活力。

关键词: 金黄色葡萄球菌核酸酶; 多维核磁共振; N 端 140 片段

中图分类号: Q7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6737(2003)01-0007-06

金黄色葡萄球菌核酸酶 (staphylococcal nuclease, E.C.3.1.4.7; SNase) 是金黄色葡萄球菌分泌到细胞外的一种核酸非专一性磷酸二酯酶, 分子量 16 807 道尔顿, 简称核酸酶(SNase)。核酸酶是由 149 个氨基酸残基组成的单链球蛋白, 不含半胱氨酸和二硫键, 能够可逆去折叠和重折叠。在 Ca^{2+} 存在下, 可催化 DNA 和 RNA 水解生成 3'-单核苷酸和 3'-二核苷酸。3',5'-二磷酸胸苷 pdTp (thymidine 3',5'-bisphosphate) 能与核酸酶紧密结合, 是核酸酶的竞争性抑制剂。核酸酶是研究蛋白质结构功能关系、蛋白质折叠和动力学的重要模型。Foggi 菌株核酸酶的晶体三维结构^[1]和 V8 菌株核酸酶的溶液三维结构^[2]均已确定。Shortle 等^[3]构造了一系列的核酸酶 N 端肽段(1~103, 1~112, 1~128 和 1~136 等残基片段), 研究这些片段的残余结构。静国忠研究组也构造了不同长度的 R 型核酸酶 N 端片段, 运用光谱、胍脲变性、测活等物理化学方法研究这些片段的性质和折叠情况。在研究中发现, SNase R139 (-6~139) 的酶活是 SNase R140 (-6~140) 的 93%, 而 SNase R140 的酶活力只有 SNase R141 (-6~141) 的 60%^[4]。为了在溶液三维结构水平上分析核酸酶 140 片段的构象状态, 了解氨基酸残基之间的相互作用与酶蛋白构象以及酶活力之间的关系, 我们构建了 V8 菌株核酸酶的 N 端 140 片段 SNase140 (1~140)。运用异

核多维核磁共振以及圆二色和荧光光谱研究了 V8 菌株核酸酶 SNase 全酶和 SNase140 片段, 对实验结果进行了综合分析。

1 材料和方法

1.1 V8 菌株核酸酶片段 SNase140 的基因构建、蛋白表达与纯化

V8 菌株核酸酶 1~140 片段的基因从全长 V8 菌株核酸酶基因经 PCR 扩增获得。扩增模板为 pTSN2cc^[5]。在核酸酶基因对应于第 140 位残基后引入终止密码子 TAA, 5' 端引物为: 5'-CTCCCATGGCAACTTCAACTAAAAATTAC-3', 含 Nco I 酶切位点; 3' 端引物为: 5'-CGCGGATCCTTACCAAATATTTAATTTCTC-3', 含终止密码子和 BamH I 酶切位点。PCR 扩增产物经 Nco I 和 BamH I 双酶切后与表达载体 pET-3d 重组, 并转入 BL21(DE3)/pLysS 菌株。

天然丰度的 SNase140 片段在 LB 培养基中经

收稿日期: 2002-08-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(39570170、39823001)

作者简介: 徐立东, 1972 年生, 硕士研究生

通讯作者: 王金凤, 电话: (010) 64888490, E-mail:

jfw@sun5.ibp.ac.cn

IPTG诱导 3 h 表达后提纯。每 1 L 收获的菌体离心沉降后, 用 30 ml 冰冻裂解液(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 7.6, 2.5 mmol/L EDTA)重悬, 于 -20°C 放置 2 h, 然后在 37°C 水浴中解冻。加入 1.0 ml 1 mol/L CaCl_2 溶液, 置于室温 1 h 后, 于 4°C 以 10 000 rpm 的速度离心 15 min, 取上清, 立即过 Sephadex CM-25 弱阳离子交换柱, 用 280 nm 紫外吸收监测柱子的洗脱过程。洗脱液为 0.2 mol/L Tris-HCl, pH 7.6, 1.0 mol/L NaCl。收集的洗脱峰在 4°C 下对去离子水透析 6 次, 离心除去透析过程中出现的少量沉淀后, 将上清冷冻干燥, 得到的蛋白干粉于 -20°C 保存备用。同位素 ^{15}N 单标记以及 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 双标记酶蛋白片段在 M9 培养基中诱导表达后提纯。M9 培养基中的 NH_4Cl 和葡萄糖分别用 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 和 ^{13}C 标记的葡萄糖代替, 以提供同位素标记蛋白质的唯一氮源和碳源。标记蛋白质的纯化条件同上所述。蛋白干粉的纯度经 15% SDS-PAGE 电泳检测为一条带。表达产率为 40 mg/L。

1.2 酶活力测定

核酸酶的活力按 Cuatrecasas 等^[6]的方法测定。在 25°C 下, 用 Shimadzu UV-250 紫外分光光度计监测活体系在 260 nm 的吸光度随时间的变化。测活体系含 20 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L Ca^{2+} , 50 mg/L DNA, pH 7.4。

1.3 圆二色谱的测定

V8 菌株核酸酶全酶及核酸酶 140 片段的远紫外 CD 光谱 (190~250 nm) 由 Jasco J-720 分光偏振光谱仪在 25°C 测定。测量时的光径为 0.1 mm, 扫描 10 次, 取平均值。酶蛋白样品溶于

20 mmol/L Tris-HCl、pH 7.4 的缓冲溶液中, 浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 。CD 光谱值用平均残基椭圆度 $[\theta]$ 表示。在 SNase140、TMP 和 Ca^{2+} 三元复合物的样品中, SNase140:TMP: Ca^{2+} 浓度比为 1:5:10, 其中 TMP 为抑制剂 pdTp 的类似物。

1.4 内源荧光光谱的测量

由 Hitachi F4010 荧光光谱仪在 25°C 测量核酸酶蛋白样品的色氨酸内源荧光光谱。激发波长为 295 nm, 发射波长为 325 nm。激发与发射带宽都为 10 nm。蛋白样品溶于 20 mmol/L Tris-HCl、pH 7.4 的缓冲溶液中, 浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 。在 SNase140、TMP 和 Ca^{2+} 三元复合物的样品中, SNase140:TMP: Ca^{2+} 浓度比为 1:5:10。

1.5 异核多维核磁共振实验

所有多维核磁共振实验均在 Bruker DMX600 核磁共振谱仪上完成。 ^{15}N 标记或 $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ 双标记核酸酶蛋白样品溶于 90% H_2O / 10% D_2O , 50 mmol/L 氘代 NaAc, 100 mmol/L KCl, pH 5.0 的缓冲溶液中, 蛋白质的浓度为 1.0 mmol/L。在 300 K 温度下, 收集了 2D $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC, 3D $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ HNCOC、HNCACB、CBCA(CO)NH 等核磁共振实验数据。谱图的处理和分析使用了 Accelrys 的 Felix98 软件。 ^1H 化学位移相对于内标 DSS (0 ppm) 标定, ^{15}N 和 ^{13}C 的化学位移通过计算间接标定。

2 结 果

2.1 SNase140 的多维核磁共振波谱

图 1A 给出 V8 菌株核酸酶 140 片段 SNase140

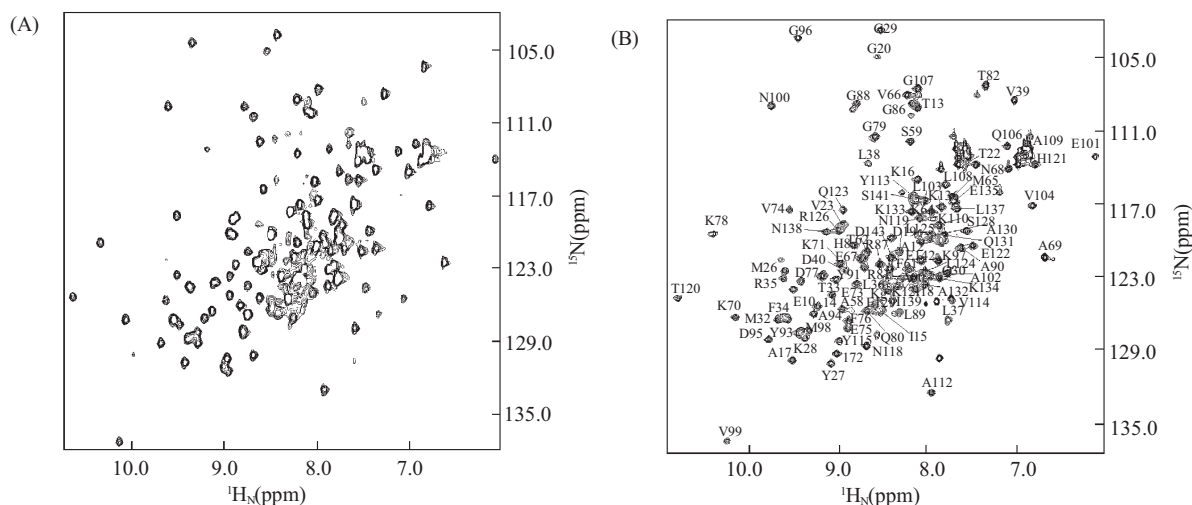


Fig.1 (A) 2D $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC spectrum of SNase140 at 300 K. The spectrum was recorded on a Bruker DMX 600 spectrometer. The ^{15}N carrier frequency was centered in the amide region. (B) 2D $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC spectrum of V8 strain SNase^[2] is presented for comparison

的二维 ^1H - ^{15}N HSQC 核磁共振波谱。谱图表明 SNase140 的 $^1\text{H}_\text{N}$ 共振峰分布范围为 6.0~10.7 ppm, ^{15}N 共振峰的分布范围为 103~137 ppm。而已知无规卷曲肽链的 $^1\text{H}_\text{N}$ 共振峰化学位移范围为 8.1~8.9 ppm。显然, SNase140 在水溶液中不是处于无规卷曲状态, 而是具有相应程度的有序二级结构和三级结构的酶蛋白片段。图 1B 同时给出 V8 菌株核酸酶 SNase 的二维 ^1H - ^{15}N HSQC 谱^[2] 以作比较。

对 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 同位素双标记的 SNase140 样品所完成的三维异核核磁共振实验可以提供酶蛋白片段骨架共振峰的序列指认。以 SNase140 的 E67~F76 肽段的三维 $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ HNCACB 波谱的二维截面为

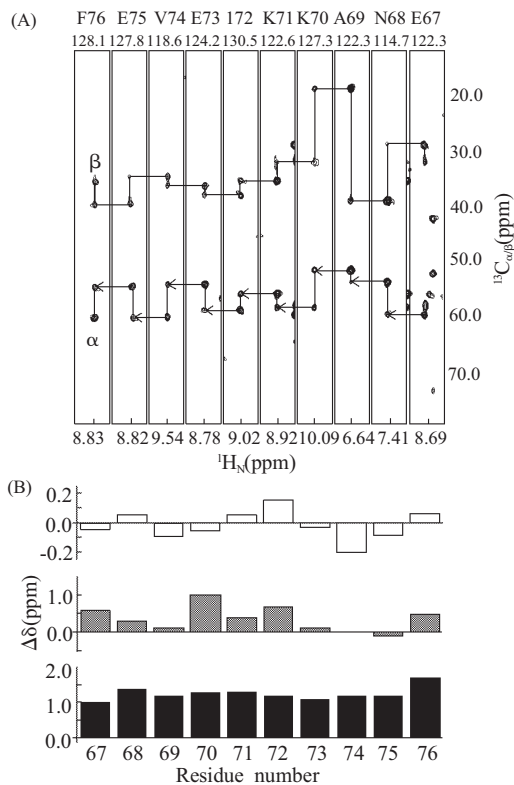


Fig.2 (A) Series of strips selected from ^1H - ^{13}C slices of the 3D ^1H - ^{13}C - ^{15}N HNCACB spectrum. The strips are selected corresponding to the residues of segment E67~F76. The assignment of each strip is indicated at the top by amino acid code and residue number. The corresponding ^{15}N chemical shift of the slice is also noted at the top of each strip. (B) Diagrammatic representation of the chemical shift changes of SNase140 in comparison with that of SNase. The chemical shift changes (in ppm) of $^1\text{H}_\text{N}$, ^{15}N , $^{13}\text{C}_\alpha$ are plotted versus the residue number. □ $^1\text{H}_\text{N}$ ■ ^{15}N

例(图 2A), 在由各氨基酸残基 ^{15}N 化学位移所确定的二维截面中, 可以观察到该残基的 $^1\text{H}_\text{N}$ - $^{13}\text{C}_\alpha$ 的交叉峰 (标有 α 字母), 同时还可以观察到 $^1\text{H}_\text{N}$ 与前一位氨基酸残基 $^{13}\text{C}_\alpha$ 的交叉峰。由此, 可以完成蛋白质骨架 $^1\text{H}_\text{N}$ 、 ^{15}N 、 $^{13}\text{C}_\alpha$ 以及 $^{13}\text{C}_\beta$ 的序列指认, 并获得这些残基 $^1\text{H}_\text{N}$ 、 ^{15}N 、 $^{13}\text{C}_{\alpha/\beta}$ 共振的相应的化学位移。在图 2B 中给出了这一肽段的 $^1\text{H}_\text{N}$ 、 ^{15}N 、 $^{13}\text{C}_\alpha$ 化学位移与 V8 菌株核酸酶 SNase^[2] 相应残基肽段化学位移的比较。

图中 $\Delta\delta$ 表示 SNase140 中的化学位移与 SNase 中的相应化学位移之差。参照通常衡量具有有序结构蛋白质区别于无规卷曲肽链的标准, 即蛋白质的化学位移与无规卷曲相应的化学位移差别 ($^1\text{H}_\text{N} > 0.3$ ppm, $^{15}\text{N} > 2$ ppm, $^{13}\text{C}_\alpha > 0.6$ ppm), 蛋白质不是处于无规卷曲状态, 可以看到, 图 2B 所显示的 $\Delta\delta$ 表明 SNase140 中这一肽段的化学位移与 SNase 相应残基的化学位移差别没有给出由于构象不同而造成的显著变化。(需要说明的是, SNase 的 ^{15}N 与 ^{13}C 化学位移定标方式不同。因而, 可能导致了 ^{13}C 化学位移差别中的固定偏差。)

2.2 SNase 及 SNase140 的圆二色谱

V8 菌株 SNase、SNase140、SNase140 和 TMP 及 Ca^{2+} 复合物的远紫外圆二色谱显示在图 3 中。

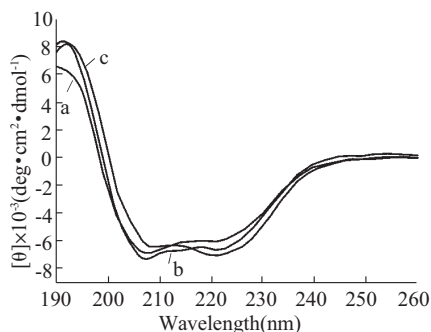


Fig.3 Far-UV CD spectra of SNase, SNase140 and SNase140 in the presence of TMP and Ca^{2+} . a: SNase140; b: SNase140+TMP+ Ca^{2+} ; c: SNase

与 SNase 的双负峰相比, SNase140 的圆二色也呈现双负峰。但是, 在 220 nm 处的负峰强度明显降低, 而在 208 nm 处的负峰强度明显大于 220 nm 处的峰强。所以, 与 SNase 相比, SNase140 α 螺旋中出现了无序成分。而在 SNase140 和 TMP 及 Ca^{2+} 复合物的圆二色谱中, 220 nm 峰强比 SNase140 中的增强。这可以理解为 TMP 和 Ca^{2+} 的结合改善了 α 螺旋构象的稳定性。

2.3 SNase 及 SNase140 的荧光光谱

SNase 的第 140 位残基是色氨酸。因而在 SNase140 中, N 末端残基为色氨酸。图 4 给出了

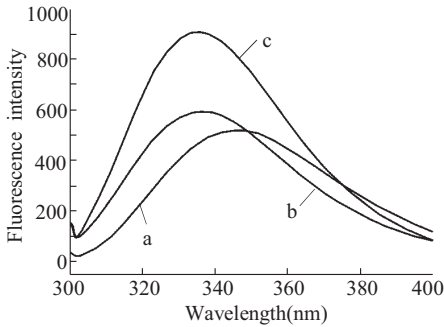


Fig.4 Tryptophan fluorescence emission spectra of SNase, SNase140, and SNase140 in the presence of TMP and Ca^{2+} . a: SNase; b: SNase140+TMP+ Ca^{2+} ; c: SNase

它们的色氨酸荧光光谱。

由图可以明显看出, 相对于 SNase 的色氨酸发射光谱, SNase140 的色氨酸发射光谱红移且强度减弱。TMP 和 Ca^{2+} 与 SNase140 结合后, SNase140 的峰强增加而且蓝移。色氨酸荧光光谱的变化明确指出, 在 SNase140 中 W140 残基所位于的空间构象状态发生了较大的变化。

3 讨 论

金黄色葡萄球菌 V8 菌株与 Foggi 菌株分泌的核酸酶在序列上只相差一个氨基酸, Foggi 菌株核酸酶的第 124 位氨基酸是组氨酸, 而 V8 核酸酶的是亮氨酸。V8 核酸酶相对更稳定。V8 菌株核酸酶的核磁共振溶液三维结构与 Foggi 核酸酶的晶体结构一致。核酸酶的三维结构(图 5)包含了两个亚结构域, β 亚结构域和 α 亚结构域。 β 亚结构域由 β 桶和两个 α 螺旋组成。其中, β 桶主要由, β 片层

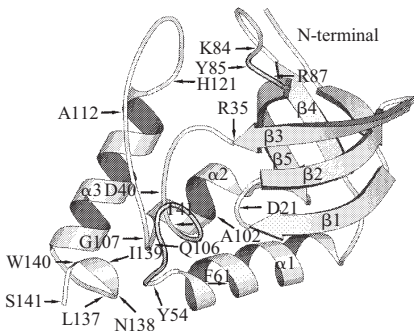


Fig.5 MOLSCRIPT representation of SNase structure. The regular secondary structures are labeled. The relevant amino acid residues are indicated with the one-letter code and the residue number

I (β 1: A12~A17, β 2: T22~M26, β 3: M32~R35), β 片层 II (H8~A12, β 4: I72~E75, β 5: Y91~Y93) 构成, 而两个 α 螺旋为 α I: A58~A69 和 α II: M98~Q106。 β 桶构成了酶蛋白的疏水核心。 α 亚结构域主要包含了 α 螺旋 III, 即 α III: E122~K136。 α 亚结构域与 β 亚结构域之间通过氢键保持相对稳定的构象态。

亚结构域间的缝隙是核酸酶的活性部位。Loop K78~L89, Loop A112~H121 以及肽段 F34~L38 构成了抑制剂的结合部位。残基 R35, K84, Y85 和 R87 是抑制剂的结合位点。残基 D21, D40, T41 以及一个水分子提供了 Ca^{2+} 结合的配体。由图 1 给出的核酸酶 SNase 及 SNase140 的二维 ^1H - ^{15}N HSQC 核磁共振谱可以看到, SNase 及 SNase140 的 $^1\text{H}_\text{N}$ 以及 ^{15}N 共振的化学位移分布相似, 说明 C 端去 9 肽后, 核酸酶的二级结构成分以及空间结构未有重大变化。对 SNase140 三维核磁共振谱的分析结果进一步表明, 已被指认的 β 亚结构域部分共振峰的化学位移与天然态酶蛋白 SNase^[7] 相应峰的化学位移值接近。图 2 所列举的 SNase140 E67~F76 肽段的核磁共振数据清楚地表明, 与天然酶蛋白 SNase 相应残基的化学位移相比, 这些残基的 $^1\text{H}_\text{N}$ 、 ^{15}N 和 $^{13}\text{C}_\alpha$ 化学位移无显著变化。由于共振核的化学位移对所处的微环境和局域构象变化非常敏感, 因此, SNase140 的 β 亚结构域部分构象基本上应保持类天然态构象。而 SNase 与 SNase140 构象上的不同主要应集中在 W140 所处的局域构象空间。

核酸酶三维结构显示, α III 螺旋 C 末端的 Loop (L137~S141) 与 α II 螺旋 C 末端以及 α I 螺旋 N 末端残基构成了一个小疏水区。残基 I139 与 Y54、A102 与 F61、L108 与 F61 之间有 NOE 相关^[2], 并且在残基 L137 与 W140、N138 与 Q106、I139 与 G107、S141 与 N138 之间有氢键形成^[1]。由此, 核酸酶 C 末端去 9 肽后, 残基 S141 缺失, 将扰乱这一区域的氢键网络和疏水相互作用。这将影响酶蛋白片段 SNase140 此区域构象的稳定性。CD (图 3) 和荧光光谱 (图 4) 指出, S141 残基的缺失使 W140 残基所在的空间构象松散, W140 暴露, 也影响了 α III 螺旋的构象稳定性。TMP 和 Ca^{2+} 与 SNase140 上的活性部位结合后, W140 所处的构象空间趋于紧凑, W140 也趋于内埋, 酶蛋白片段的整体构象朝向核酸酶天然构象变化。这一光谱现象说明, W140 所处的局域构象空间与酶蛋白活性部

位的构象空间之间有内在联系, 相互并不独立存在。显然, 残基 141 缺失所造成的扰动将通过 α 亚结构域与 β 亚结构域之间的氢键相互作用而影响了酶蛋白的空间构象状态。

对 V8 菌株核酸酶及其片段的酶活力测定指出, N 末端 140 片段 (SNase140) 水解 DNA 的活力是全酶的 44%。静国忠研究组对 R 型核酸酶 N 末端 141 片段 (SNase R141) 的活力测定为全酶的 76%。对 SNase 溶液三维结构的研究已指出, 天然酶蛋白 SNase 在水溶液中以多种构象态存在, 酶蛋白一旦与底物结合就以一个稳定的主构象态存在^[2], 从而可以完成酶蛋白的生理功能。由此可以认为, SNase140 在水溶液中同样处于多种构象态之间的变换, 底物的结合可以导致其构象处于某一稳定态。但是, SNase140 的相对稳定的构象态与天然酶蛋白的稳定构象态之间的差异将导致其水解 DNA 的相对活力的差异。而在酶蛋白 N 端 141 片段 (SNase R141) 中, 虽然 C 端去了 8 肽, 但是 S141 残基的存在对该局域空间的残基间氢键以及疏水相互作用影响相对较小, 因而酶的活力也高于 SNase140。对 SNase140 的上述研究分析指出, 远离酶蛋白活性部位残基间相互作用的变化及其所导致的局域空间构象的变化, 将通过对酶蛋白两个亚结构域间形成的氢键的影响, 影响到酶蛋白活性部位的空间构象, 从而影响酶蛋白的活力。

参考文献:

- [1] Loll PJ, Lattman EE. The crystal structure of the ternary complex of staphylococcal nuclease, Ca^{2+} , and the inhibitor pdTp, refined at 1.65Å [J]. *Proteins*, 1989,5:183~201.
- [2] Wang JF, Truckses DM, Abildgaard F, et al. Solution structures of staphylococcal nuclease from multidimensional, multinuclear NMR: nuclease-H124L and its ternary complex with Ca^{2+} and thymidine-3',5'-bisphosphate [J]. *J Biomol NMR*, 1997,10:143~164.
- [3] Shortle D, Meeker AK. Residual structure in large fragments of staphylococcal nuclease: effects of amino acid substitutions[J]. *Biochemistry*, 1989,28:936~944.
- [4] Yin J, Jing G. Tryptophan 140 is important, but serine 141 is essential for the formation of the integrated conformation of staphylococcal nuclease [J]. *J Biochem (Tokyo)*, 2000,128:113~119.
- [5] Wang JF, LeMaster DM, Markley JL. Two-dimensional NMR studies of staphylococcal nuclease. 1. Sequence-specific assignments of ^1H signals and solution structure of the nuclease H124L-thymidine 3',5'-bisphosphate- Ca^{2+} ternary complex [J]. *Biochemistry*, 1990,29:88~101.
- [6] Cuatrecasas P, Fuchs S, Anfinsen CB. Catalytic properties and specificity of the extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus* [J]. *J Biol Chem*, 1967,242:1541~1547.
- [7] Wang JF, Hinck AP, Loh SN, et al. Solution studies of staphylococcal nuclease H124L. 2. ^1H , ^{13}C , and ^{15}N chemical shift assignments for the unligated enzyme and analysis of chemical shift changes that accompany formation of the nuclease-thymidine 3',5'-bisphosphate-calcium ternary complex [J]. *Biochemistry*, 1992,31:921~936.

THE INFLUENCE OF DELETION OF 9 RESIDUES AT THE C-TERMINAL OF STAPHYLOCOCCAL NUCLEASE ON THE CONFORMATION OF THE ENZYME

XU Li-dong, TONG Yu-feng, WANG Jin-feng

*(National Laboratory of Biomacromolecules, Center for Molecular Biology, Institute of Biophysics,
The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)*

Abstract: Combining the multidimensional NMR with CD and fluorescence methods, the solution conformations of staphylococcal nuclease from V8 strain (SNase) and its N-terminal 1~140 fragment (SNase140) as well as the ternary complex of SNase140, TMP (Thymidine 5'-monophosphate), and Ca^{2+} have been studied. The experimental data reveals that deletion of the nine residues at the C-terminal of SNase has influenced the enzyme conformation and activity. Inspection of 3D structure of staphylococcal nuclease indicates that the hydrogen bonds formed between α and β subdomains of the enzyme must be disturbed by the deletion of the amino acid residues succeeding Trp140 of SNase. In consequence, the changes in the interaction between amino acid residues located away from enzyme active site will disturb the conformational state of enzyme active site, and thus influence on the activity of enzyme protein.

Key Words: Staphylococcal nuclease; Multidimensional NMR; N-terminal 140 fragment