

膜蛋白三维结构研究的新突破

——线粒体呼吸链膜蛋白复合物 II 结构解析*

孙 飞¹ 饶子和²

(1 清华大学蛋白质科学教育部重点实验室 北京 100084

2 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 由清华大学-中科院生物物理所结构生物学联合研究小组完成的“线粒体呼吸链膜蛋白复合物 II 的晶体结构”研究成果以 Article 的方式发表在 2005 年 7 月 1 日出版的 *Cell* 上。本文介绍了该项成果的研究背景、意义、主要创新点及方法。

关键词 线粒体,呼吸链,复合物 II,膜蛋白,晶体结构

线粒体作为细胞器,是真核细胞活动的主要供能单位,一般分布在细胞功能旺盛的区域;像心肌细胞,肾脏细胞,肠表皮细胞等大量耗能细胞中,线粒体的含量非常高。线粒体是细胞发生呼吸作用的主要场所,包括柠檬酸循环和氧化磷酸化两个过程。线粒体氧化磷酸化的电子传递链(又称呼吸链)位于线粒体内膜,由 4 个分子量很大的跨膜蛋白复合体(复合物 I、II、III、和 IV)和介于 I、II 和 III 之间的辅酶 Q 及介于 III 和 IV 之间的细胞色素 C 来完成。呼吸链的功能是进行生物氧化,并与称为复合物 V 的 ATP 酶偶联,共同完成氧化磷酸化制造生物能量分子 ATP 的功能。

复合物 I 即 NADH 脱氢酶,由 42 条肽链组成,呈 L 型,含有 1 个 FMN 分子和至少 6 个铁硫蛋白,分子量接近 1MD;复合物 II 即琥珀酸脱氢酶,由 4 条肽链组成,含有 1 个 FAD 分子和 1 个铁硫蛋白,其作用是催化电子从琥珀酸转至辅酶 Q。复合物 III 即细胞色素 C 还原酶,由 11 条肽链组成,以二聚体形式存在,每

个单体包含两个细胞色素 b (b562、b566)、1 个细胞色素 C1 和 1 个铁硫蛋白。其作用是催化电子从辅酶 Q 传给细胞色素 C。复合物 IV 即细胞色素 C 氧化酶,以二聚体形式存在,其作用是将从细胞色素 C 接受的电子传给氧。最终阐述这些复合物的电子传递机制和跨膜质子泵的工作原理有待于它们晶体结构的解析。

至今只有少数几个物种中分离的复合物 IV 和复合物 III 的晶体结构得到了解析。1995 年, Tomitake Tsukihara 等首次获得了细胞色素 C 氧化酶晶体的高分辨率数据,电子密度图清楚地显示了各个金属结合中心^[1];1997 年, Di Xia 等基于 2.9 埃的衍射数据,解析了牛心线粒体复合物 III 的部分结构^[2];1998 年, Zhaolei Zhang 等解析了鸡心和牛心的线粒体复合物 III 结合抑制剂时的结构,发现铁硫蛋白外部结构域有两种位置,由此提出了醌的氧化和细胞色素 C1 的还原是通过铁硫蛋白外部结构域的运动来完成的^[3];此后的 7 个月, So Iwata 等报告了牛心线粒体复合物 III 11 个亚单位的完整晶体结构,电子传递核心区域的电子密度可

* 收稿日期:2005 年 8 月 20 日

以清楚看到,在不同晶型中发现,Rieske铁硫蛋白有不同的构型,从而进一步解释了电子传递的机制,同时,也解释了该复合物作为MPP(mitochondrial processing peptidase)的第二种功能^[4]。1998年,Shinya Yoshikawa等人分别解析了细胞色素C氧化酶的氧化态,还原态,叠氮化钠结合态,一氧化碳结合态的晶体结构,从结构分析指出了质子泵位点和氧还原质子化位点的关键氨基酸^[5]。

在此之前,关于线粒体复合物I、II的精细结构一直没有得到解析。线粒体复合物II又称为琥珀酸泛醌氧化还原酶(线粒体SQR),作为琥珀酸脱氢酶,它催化三羧酸循环中琥珀酸到延胡索酸的氧化,同时,琥珀酸的氧化与线粒体内膜中辅酶Q的还原通过电子传递所耦合,电子通过一系列包埋在该复合物中的电子传递体FAD,[2Fe-2S],[4Fe-4S],[3Fe-4S]以及血红素来完成了从琥珀酸到辅酶Q的传递。线粒体复合物II属于琥珀酸泛醌氧化还原酶家族,这个家族中的酶通常包含1个水溶性的具有催化活性的异二聚体和1个完整的跨膜部分。水溶性异二聚体由亚基A(即黄素蛋白,内含1个共价结合的FAD辅因子)和亚基B(即铁硫蛋白,内含[2Fe-2S],[4Fe-4S],[3Fe-4S])组成。跨膜部分将整个复合物铆钉在线粒体内膜上,这个部分通常由1个和2个疏水的穿膜蛋白组成,有的含有血红素,有的没有。根据跨膜部分组成蛋白的数目以及包含血红素的数目,这个家族的酶可以分成A—E5类。线粒体复合物II属于C类型,包含1个血红素分子和2个穿膜蛋白(CybL和CybS)。在此之前,关于琥珀酸泛醌氧化还原酶的结构研究在原核生物中取得了一些进展,Tina M. Iverson等于1999年解析了大肠杆菌QFR(含有4个亚基)的3.3埃结构^[6];同年11月,C. Roy、D. Lancaster等解析了Wolinella succinogenes中QFR(含有3个亚基)的2.2埃的结构^[7];2003

线粒体膜蛋白复合物II的精细结构图

年,So Iwata领导的小组获得了大肠杆菌SQR2.6埃的晶体结构^[8]。在此以前,人们只能利用这些原核SQR(QFR)的结构作为模型来研究线粒体复合物II。

此外,人类有很多疾病诸如嗜铬细胞瘤,副神经节瘤和李氏症等均与线粒体复合物II的翻译提前中止或氨基酸突变相关,这些疾病多表现为活性氧自由基引起的神经性紊乱,而活性氧自由基的产生与电子在线粒体复合物II中传递中的泄漏有关。关于这些疾病产生的分子机理需要以复合物II的三维精细结构为基础。

鉴于线粒体复合物II晶体结构解析的重要而深远意义,我们研究组历时3年,以猪心为原材料从中提取线粒体复合物II,并解析了该膜蛋白复合物2.4埃的结构以及其与抑制剂3-硝基丙酸盐(NPA),2-噻吩甲酰三氟丙酮(2-TTFA)的复合体3.5埃的结构,填补了线粒体呼吸链结构生物学研究的一个空白^[9]。

整个复合物II看上去象字母q的形状,有一个亲水的头部和一个穿膜的尾巴。通过分

析穿膜螺旋,我们发现在该复合物尾部分布了 5 个带电的氨基酸和 2 个极性的氨基酸,表明复合物 II 是一个穿膜蛋白复合物,从而纠正了教科书中一直存在的错误,即认为复合物 II 是一个外周膜蛋白。此外,通过分析该复合物在晶体中的排列,我们推测它在线粒体内膜上是以单体形式发挥功能的,这一点与复合物 III 的二体功能单位是不同的,也与原核生物 SQR 的二体/三体化现象不同。

基于 2.4 埃高分辨率的结构,我们仔细分析了各个组成单位亚蛋白的结构,并研究了它们的相互作用和接触面,发现 CybL 的 N 端有一个亲水的 α 螺旋,位于线粒体基质中,与铁硫蛋白相互作用,这种相互作用占了跨膜部分与铁硫蛋白相互作用的 40%,说明该螺旋在复合物 II 的组装以及跨膜部分与铁硫蛋白的识别中具有重要的作用。

除了对各个电子传递体 (FAD, [2Fe-2S], [4Fe-4S], [3Fe-4S] 以及血红素分子) 进行精确定位外,我们在该结构跨膜区靠近线粒体基质一端的口袋 Qp 中,发现了一些电子密度,认为是所结合的辅酶 Q 的头部结构,这一点被与抑制剂结合的复合体的结构所证明。在该结构中, 2-TTFA 恰好结合在口袋 Qp 中,同时,我们还发现了第二个 2-噻吩甲酰三氟丙酮的结合位点,位于跨膜区靠近线粒体膜间隙一端的口袋 Qd 中,这个发现具有全新的意义,将影响人们对电子在复合物 II 中传递以及辅酶 Q 在复合物 II 与 III 之间转移的认识,促使人们重新复合物 II 在线粒体呼吸链中的角色。

通过比较线粒体复合物 II 和大肠杆菌 SQR 的结构,我们进一步证明了电子传递体的氧化还原电位是受其周围的氨基酸环境调节的;此外,线粒体复合物 II 和大肠杆菌 SQR 具有相似的亲水头部,但是跨膜部分却有很大的差别,从而解释了用大肠杆菌 SQR 的结构作为线粒体复合物 II 模型的局限性。

利用线粒体复合物 II 的结构对已知与人类疾病相关的该复合物突变位点进行了精确

定位,发现这些突变位点均位于电子传递体或辅酶 Q 结合位点的周围,它们的突变或影响了电子传递体的结合,或影响了辅酶 Q 的结合,从而导致电子传递的中断,逃逸到线粒体基质中或线粒体内膜中,经过一系列下游途径导致疾病的产生。因此,线粒体复合物 II 的结构解析为研究与该复合物相关的人类线粒体疾病提供了一个真实可用的模型。

20 年前第一个膜蛋白复合体 (紫细菌光合中心) 结构的解析打破了膜蛋白不能结晶的误区,此后膜蛋白的纯化和晶体培养成为蛋白质晶体学的热点,膜蛋白的结构解析也一直被认为是高难水平的工作,线粒体复合物 II 是世界上获得的为数不多的膜蛋白复合体结构中的一员 (截至 2005 年 7 月 23 日,世界上仅解析了 95 个独立的膜蛋白结构),也是我国继去年生物物理所获得的菠菜捕光蛋白复合物 II 之后的第二个膜蛋白结构^[10],这一成果表明我国的膜蛋白三维结构研究已经进入国际先进行列。

致谢 该研究得到国家“973”项目、国家“863”项目和国家自然科学基金的资助和支持。

主要参考文献

- 1 Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E *et al.* Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*, 1995, 269: 1 069-1 074.
- 2 Xia D, Yu C A, Kim H *et al.* Crystal structure of the cytochrome bc₁ complex from bovine heart mitochondria. *Science*, 1997, 277: 60-66.
- 3 Zhang Z, Huang L, Shulmeister V M *et al.* Electron transfer by domain movement in cytochrome bc₁. *Nature*, 1998, 392: 677-684.
- 4 Iwata S, Lee J W, Okada K *et al.* Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *Science*, 1998, 281: 64-71.
- 5 Yoshikawa S, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R *et al.*

- Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase. *Science*, 1998, 280: 1 723-1 729.
- 6 Iverson T M, Luna-Chavez C, Cecchini G *et al.* Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex. *Science*, 1999, 284: 1 961 -1 966.
- 7 Lancaster C R, Kroger A, Auer M *et al.* Structure of fumarate reductase from *Wolinella succinogenes* at 2.2 Å resolution. *Nature*, 1999, 402: 377-385.
- 8 Yankovskaya V, Horsefield R, Tornroth S *et al.* Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science*, 2003, 299: 700-704.
- 9 Sun F, Huo X, Zhai Y J *et al.* Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*, 2005, 121: 1 043-1 057.
- 10 Liu Z, Yan H, Wang K *et al.* Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature*, 2004, 428: 287-292.

Crystal Structure of Mitochondrial Respiratory Membrane Protein Complex II (Succinate Ubiquinone Oxidoreductase)

Fei Sun Zihe Rao

(The Laboratory of Structural Biology, Tsinghua University, 100084 Beijing)

(Institute of Biophysics, CAS, 100101 Beijing)

An article entitled "Crystal Structure of Mitochondrial Respiratory Membrane Protein Complex II" was published in the July 1st, 2005 issue of the journal *Cell*. This research work was accomplished by the "Tsinghua-Institute of Biophysics Joint Research Group for Structural Biology". Here we present a brief introduction concerning the scientific background, significance, methods and also the main creative results of this research.

Keywords mitochondrial, respiratory chain, Complex II, membrane protein, crystal structure

孙飞男, 博士研究生。2001年毕业于南京大学基础教学强化部, 同年免试进入清华大学结构生物学实验室, 师从饶子和院士, 攻读生物物理与结构生物学专业博士学位。作为“线粒体呼吸链膜蛋白复合物II结构与功能研究”课题主要研究人员, 全面参与了该课题从样品纯化、结晶、衍射数据的收集、相位解析、电子密度的解释和结构模型的构建以及结构与功能关系讨论的全过程, 为该课题的最终突破和完成做出了非常重要的贡献。*Cell* 论文的第一作者

饶子和男, 中科院院士, 第三世界科学院院士, 生物物理研究所所长, 清华大学医学院副院长, 清华大学结构生物学实验室主任, “线粒体呼吸链膜蛋白复合物II结构与功能研究”课题负责人, *Cell* 论文通讯作者。