

细胞色素 b_5 S64X 突变体对蛋白结构及稳定性的影响

官墨蓝 王中华 林英武 黄仲贤*
(复旦大学化学系化学生物学实验室, 上海 200433)

摘要: 为了深入了解细胞色素 b_5 (Cyt b_5)64 位氨基酸残基 (Ser64) 对血红素辅基微环境及蛋白质性质的影响, 我们分别对 Cyt b_5 Ser64 进行了保守性突变(S64T)以及非保守性突变(S64K、S64N 和 S64H), 均为亲水性氨基酸残基。对野生型细胞色素 b_5 及其突变体蛋白 S64X(X: T, K, N 或 H)的热、酸、盐酸胍变性的稳定性研究表明: 4 个突变体蛋白的稳定性相对于野生型都大大降低了; CD 光谱表明, 细胞色素 b_5 S64X 突变体中的 α -螺旋明显减少, 芳香性氨基酸残基所处的肽链结构受到了影响; 盐酸胍变性荧光光谱表明, Trp22 周围的蛋白肽链受到了影响, Trp22 暴露于水溶液的程度加大。我们认为 Ser64 不仅对血红素辅基有稳定作用, 同时还对维持蛋白 Core 1 中的第 5 个 α -螺旋结构有重要的作用, 在 64 位引入其他氨基酸残基影响了第 5 个 α -螺旋的结构, 并通过蛋白肽链的相互作用, 使得 Trp22 所在的 Core 2 结构也受到了较为明显的扰动。

关键词: 细胞色素 b_5 ; Ser64 突变体; 稳定性; α -螺旋; 血红素

中图分类号: Q513; Q518.4; Q615

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2008)01-0047-08

Effect of Mutation at Ser64 on the Structure and Stability of Cytochrome b_5

GUAN Mo-Lan WANG Zhong-Hua LIN Yin-Wu HUANG Zhong-Xian*
(Chemical Biology Lab, Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract: To understand the influence of Ser64 on the structure and stability of cytochrome b_5 , a study was made for the conserved mutation in cytochrome b_5 S64T, and non-conserved mutations in the cytochrome b_5 S64K, S64N and S64H mutant proteins, in which all substitutes are hydrophilic amino acids. The UV-Vis spectroscopy, CD spectra, and stability studies were done to find out the changes of structures and stabilities. The stability studies of wild type cytochrome b_5 and its S64X (X: T, K, N or H) mutants show that, the stabilities of S64X mutant decrease distinctly. CD spectra show the percentage of α -helix decreases obviously, and fluorescence spectra reflect the disturbance of the polypeptide around Trp22. These results show that, Ser64 is very important for maintaining structure of the fifth α -helix, and could disturb the Core 2, which leads to the decrease of the mutant protein structural stability.

Key words: cytochrome b_5 ; cyt b_5 Ser64 mutation; stability; α -helix; heme

细胞色素 b_5 (Cyt b_5) 是生物体内一类重要的氧化还原膜蛋白, 由 1 个血红素辅基 b 和 1 条肽链所组成。本工作使用的是经过脂肪酶消化后, 具有功能性亲水结构域的 Cyt b_5 (93 个氨基酸残基), 以这些包含血红素辅基的水溶性结构片段代替完整的膜蛋白进行 Cyt b_5 S64X 突变体蛋白的研究工作。

如图 1 所示, 该水溶性 Cyt b_5 蛋白分子由 2 个相对独立的部分组成: 含有血红素辅基的功能性亲水结构域(Core 1), 血红素辅基位于血红素疏水腔内, 中心的铁离子通过配位作用与蛋白肽链上的 His39 和 His63 发生相互作用, 行使蛋白的生理功能; 蛋白肽链的其他部分组成了 1 个由非极性的氨基酸

收稿日期: 2007-07-30。收修改稿日期: 2007-10-22。

国家自然科学基金资助项目(No.20372017)。

*通讯联系人。E-mail: zxhuang@fudan.edu.cn

第一作者: 官墨蓝, 女, 26 岁, 硕士生; 研究方向: 生物无机化学。

残基为中心构成的疏水性结构区域(Core 2),对维持蛋白的整体结构和稳定性具有重要作用。Cyt b_5 的稳定性一般包括血红素与肽链结合的稳定性与肽链二级结构的稳定性两部分,其中血红素辅基上的各取代基和位于疏水腔边缘各氨基酸残基的性质,在诱导蛋白的正确折叠与组装,维持蛋白功能和稳定性中起着重要的作用。

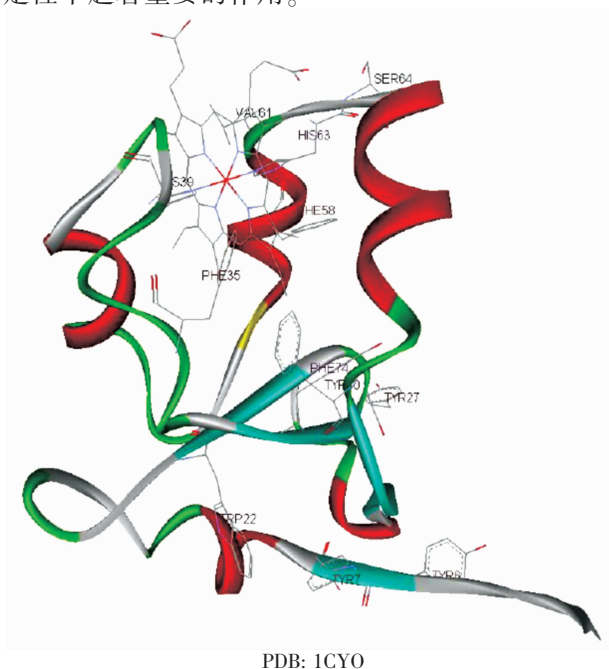


图 1 牛肝微粒体 Cyt b_5 X 射线晶体结构图
Fig.1 X-ray crystal structure of lipase-solubilized bovine microsomal Cyt b_5

对 Cyt b_5 的结构研究表明^[1,2],Ser64 处于血红素辅基一侧疏水腔边缘,血红素辅基 b 上第 7 位的丙酸根与丝氨酸形成了 2 个氢键:7 位丙酸根上的羰基氧与 Ser64 位侧链的羟基氢;丙酸根上的羧基氢与主链上的酰胺氮,如图 2 所示。Ser64 与血红素辅基上的 6、7 位丙酸根以及 Val61、Gly62 形成的氢键网络起到了稳定血红素辅基中心铁离子正电荷、保持血红素辅基构象的作用。同时 Ser64 刚好位于第 5 个 α -螺旋(H-V:Ser64-Phe74)的 N 端,通过 1 个由 3 个氨基酸残基组成的肽链 (Val61-Gly62-His63)与第 4 个 α -螺旋(H-IV:Ala54-Val61)相连,对维持肽链的螺旋结构有重要的影响^[3]。

为了研究 Cyt b_5 第 64 位氨基酸残基对血红素辅基构象、血红素疏水腔微环境以及整个蛋白肽链结构的影响,我们选择性的构建了 4 个突变体蛋白 S64T、S64K、S64N 和 S64H。其中除突变体 S64T 中 64 位的苏氨酸属于保守置换以外;另外 3 个突变体

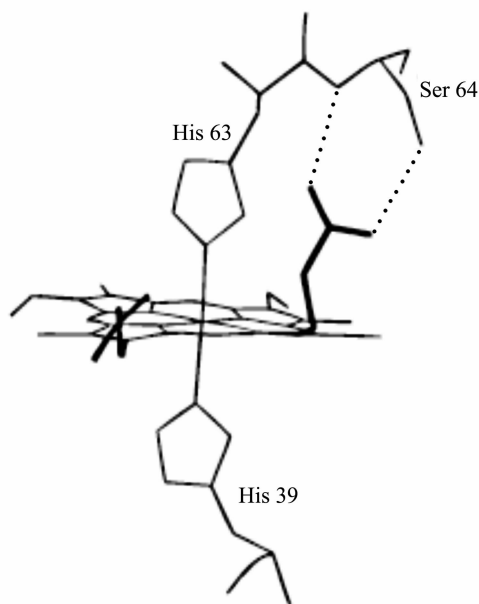


图 2 Cyt b_5 中 Ser64 与血红素辅基的相互作用
Fig.2 Two hydrogen bonds between Cyt b_5 Ser64 and the heme-propionate-7

蛋白中的 64 位氨基酸残基均为亲水性氨基酸残基,分别为:侧链较长、体积较大、带有 1 个正电荷,亲水能力很强的赖氨酸(S64K);侧链体积与赖氨酸相近但结构更刚性,带有 1 个正电荷,亲水能力相对较弱的组氨酸(S64H);以及侧链体积更小,不带电荷的天冬酰胺(S64N)。

此外,对于突变体蛋白 S64H,由于 64 位组氨酸在 Cyt b_5 中与血红素辅基平面所处的相对位置和角度,与肌红蛋白中的 His64 与血红素辅基平面所处的相对位置相近^[4],且与 Cyt b_5 轴向配体 His63 位置相邻,在 64 位引入的这个组氨酸是否能够与 63 位轴向配体组氨酸竞争配位,形成新的配位微环境;以及突变体 S64N 中 64 位的天冬酰胺侧链上的一个亚氨基和羰基氧,是否可能和血红素辅基中心铁原子有相互作用呢?这些都是我们试图探究的问题。

定点突变是研究特定氨基酸残基对蛋白结构、功能、性质影响的有力工具。热变性、酸变性和盐酸胍变性是研究蛋白稳定性的典型方法,包含很多稳定性的信息,具有很强的说明性。紫外可见光谱、圆二色谱和荧光光谱可以提供血红素辅基周围环境,蛋白肽链以及肽链中芳香性氨基酸残基所处微环境受扰动信息。从结构方面对变性实验得到的稳定性顺序的解释起到辅助作用。本论文正是从以上几个方面入手,对所构建的 4 个 Cyt b_5 S64X 突变

体的结构变化及稳定性影响进行深入的研究。

1 实验部分

1.1 Cyt b_5 及其突变体蛋白的表达与纯化

Cyt b_5 S64X 突变体基因的制备参见文献^[5],野生型细胞色素 b_5 (Cyt b_5 WT)及其突变体蛋白 Cyt b_5 S64T、Cyt b_5 S64K、Cyt b_5 S64N 和 Cyt b_5 S64H 的表达与纯化参照文献^[5,6]进行。

1.2 循环伏安法测定蛋白的氧化还原电位

蛋白的氧化还原电位在 CHI 660 电化学工作站上测定。工作电极为直径 2 mm 的金盘电极,对电极为铂丝电极,参比电极为 Ag|AgCl|KCl(3 mol·L⁻¹)($E_0=197$ mV vs SHE)。蛋白溶液用含有 100 mmol·L⁻¹ HEPES, 20 mmol·L⁻¹ MgCl₂, pH 值=7.0 的溶液配制。测定电位前分别对电极和蛋白溶液进行预处理。工作电极在麂皮上用 0.3 μ m 粒径的 Al₂O₃ 混合双蒸水抛光去氧化层,于双蒸水中超声清洗,除去附着在电极表面的 Al₂O₃ 颗粒,再用双蒸水淋洗干净后,放在 10 mmol·L⁻¹ 的半胱氨酸溶液中浸泡 20 min 后使用。蛋白溶液预先通氮气 30 min 左右,除尽蛋白溶液中所含氧气。测量过程中,氮气饱和于溶液上方,以防空气中的氧气重新进入蛋白溶液中。

1.3 圆二色光谱(CD)研究突变体蛋白的二级结构

圆二色光谱在 Jasco J715-150s 型圆二色仪(日本分光株式会社)上测定。响应时间为 0.25 s,分辨率 0.2 nm,带宽 1 cm。远紫外区(190~250 nm)采用 0.1 cm 光程的样品池,扫描速度为 100 nm·min⁻¹。可见光区(250~600 nm)采用 1 cm 光程的样品池,扫描速度为 100 nm·min⁻¹,扫描 3 次。蛋白溶液用 20 mmol·L⁻¹, pH=7.0 的磷酸盐缓冲液配制,浓度约为 20 μ mol·L⁻¹。还原态蛋白的光谱是在氧化态蛋白溶液中加入少量连二亚硫酸钠混匀后 5 min 内测定。

1.4 Cyt b_5 及突变体蛋白的热、酸、盐酸胍变性实验

热变性:蛋白的热稳定性在 HP8453 紫外可见光谱仪上测定,使用 Neslab 超级恒温槽控制温度(± 0.1 °C)。蛋白溶液的浓度为 6 μ mol·L⁻¹,缓冲溶液为 100 mmol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH=7.0)。测量的温度范围为 30~85 °C。在每个测量温度下平衡 10 min,监测蛋白溶液在 Soret 峰处吸光度的变化。

酸变性:用 100 mmol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH=7.0)配制野生型细胞色素 b_5 及其突变体蛋白溶液,

浓度约为 7 μ mol·L⁻¹。用 1 mol·L⁻¹ 的盐酸滴定。酸度用 pH-3 酸度计测量。在每点酸度平衡时间为 5 min。细胞色素 b_5 的血红素解离平衡常数 K_D 用公式拟合: $K_D=(A_H-A)/(A-A_A)$,其中 A 为 pH 值下蛋白溶液的吸光度, A_H 为蛋白未变性时的吸光度, A_A 为蛋白完全变性时溶液的吸光度。未变性蛋白占总蛋白的百分含量 f_H 由公式计算: $f_H=(A-A_A)/(A_H-A_A)$ 。 $f_H=50\%$ 时对应的 pH 值叫做酸变性中点 pH_m。

盐酸胍变性:用 100 mmol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲溶液(pH 值=7.0)配置 6 mol·L⁻¹ 的 GdnHCl 溶液,并与蛋白溶液混和,蛋白溶液的终浓度约为 6 μ mol·L⁻¹。蛋白溶液中加入变性剂 GdnHCl 的终浓度梯度范围为 0~3.3 mol·L⁻¹。于室温放置 24 h 后测定不同 GdnHCl 浓度梯度下蛋白溶液的紫外可见光谱和荧光光谱。其中荧光光谱的测定在 Cary Eclipse 荧光光度计上完成,测量范围 200~300 nm,激发波长为 298 nm,测定其 350 nm 的发射强度的变化。

2 结果与讨论

2.1 氧化还原电位

影响 Cyt b_5 氧化还原电位的因素主要有:血红素疏水腔周围氨基酸残基的亲水性,血红素辅基上丙酸根及其血红素辅基的构象等。表 1 列出了 Cyt b_5 及其突变体蛋白的氧化还原电位,以及突变体与野生型蛋白氧化还原电位的差值。野生型蛋白的氧化还原电位与文献值(10.7 mV)^[7]相当,在误差范围内(± 5 mV)是一致的^[8]。

表 1 Cyt b_5 WT 及 S64X 突变体蛋白的氧化还原电位
 E_{redox}

Table 1 Redox potential (E_{redox}) of Cyt b_5 WT and its S64X mutant proteins

Protein	E_{redox} / mV (vs SHE)	ΔE_{redox} / mV (vs SHE)
Cyt b_5 WT	+15	—
Cyt b_5 S64T	+7	-8
Cyt b_5 S64K	+10	-5
Cyt b_5 S64N	+44	+29
Cyt b_5 S64H	+42	+27

突变体蛋白 S64T 的氧化还原电位变化不明显;突变体蛋白 S64K 的氧化还原电位在误差范围内几乎没有变化;突变体蛋白 S64T 和突变体蛋白 S64N 和 S64H 相对于 Cyt b_5 WT 的氧化还原电位变化较大。我们认为这是由于保守性突变体 S64T 对血红素构象扰动较小,造成的影响不明显;突变体

S64K 中 64 位的赖氨酸则由于侧链较长,柔韧性较大^[10],且具有较强亲水能力,侧链能伸到疏水腔外部,极有可能没有对血红素辅基的构象造成明显的影响,此外,血红素疏水腔周围的亲水性所受影响也不大,氧化还原电位基本不变;突变体蛋白 S64N 和 S64H 的 64 位取代氨基酸残基的侧链体积相对于丝氨酸明显增大了,且由于侧链的刚性较强,不易伸到血红素疏水腔外,会对血红素疏水腔的内部空间产生影响,从而使得血红素辅基的构象发生转

变,氧化还原电位表现出明显的变化。

2.2 圆二色谱(CD)

对 Cyt *b*₅ 及 Ser64 位的 4 个突变体蛋白进行远紫外区的 CD 光谱检测结果显示,均在 208 nm 和 222 nm 处有 2 个明显的负吸收峰,是典型的 α -螺旋结构的 CD 光谱^[11]。根据蛋白在远紫外区域的吸收情况,利用杨氏公式^[9]计算出肽链结构中 α -螺旋(α -helix) β -折叠(β -sheet)、转角(turn)以及无规卷曲(random coil)的相对比例,列于表 2 中。

表 2 杨氏公式计算 Cyt *b*₅ WT 及 S64X 突变体蛋白的二级结构

Table 2 2nd structures of Cyt *b*₅ WT and its S64X mutations calculated by Yang's modulus

2 nd structure	Cyt <i>b</i> ₅ WT	Cyt <i>b</i> ₅ S64T	Cyt <i>b</i> ₅ S64K	Cyt <i>b</i> ₅ S64N	Cyt <i>b</i> ₅ S64H
α -helix / %	50.0	31.1	26.3	24.3	17.3
β -sheet / %	11.8	36.7	36.9	52.0	60.7
Random coil / %	38.2	32.2	36.8	23.7	21.9

相对于野生型蛋白,S64T、S64K、S64N 和 S64H 突变体蛋白肽链 α -螺旋结构的比例大大减少, β -折叠结构的比例增加,蛋白肽链二级结构受到了较大扰动。我们认为:Cyt *b*₅ 中 Ser64 与血红素辅基第 7 位丙酸根形成的氢键对于稳定第 5 个 α -螺旋有着重要的影响。当突变体蛋白 S64K、S64N 和 S64H 中引入的其他氨基酸残基破坏了 64 位与血红素辅基的氢键作用的同时,也影响了 64 位氨基酸残基与螺旋结构中其他氨基酸残基侧链的相互作用,改变了 α -螺旋中的氢键相互作用^[9],使得位于蛋白 Core 1 中的第 5 个 α -螺旋结构向 β -折叠结构转化。

图 3 为氧化态 Cyt *b*₅ WT 及 S64X 突变体在可见光区域(250~600 nm)的圆二色谱。可见光区 CD 光谱的变化主要反映了蛋白中血红素环以及芳香性氨基酸残基(苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸残基等)所处微环境的变化^[12]。这后 3 种氨基酸残基其各自的特定吸收波长分别为^[12]:苯丙氨酸,255~270 nm;色氨酸,290~305 nm;酪氨酸,275~282 nm。由图 3 可以看到,尽管在 64 位残基的突变使得蛋白肽链的二级结构发生了改变,(如同紫外 CD 光谱所示),但是这几个突变体蛋白的可见 CD 光谱却具有相似的谱型,除了突变体蛋白 S64H 在 279 nm 处具有酪氨酸的特征正吸收峰外,野生型以及另外 3 个突变体蛋白 S64T、S64K 和 S64N 均在 270 nm 和 300 nm 处具有苯丙氨酸和色氨酸的负吸收峰。这说明了 His64 的突变使得肽链整体结构受到很大的扰动,位于 Core 1 和 Core 2 结构中的芳香性氨基酸残基

Phe58(H IV),Phe74(H V)和 Trp 22(β -sheet 4),Tyr27(β -sheet 3),Tyr30(β -sheet 3)的构象均受到了很大扰动,它们的微环境和不对称性发生了明显的改变。

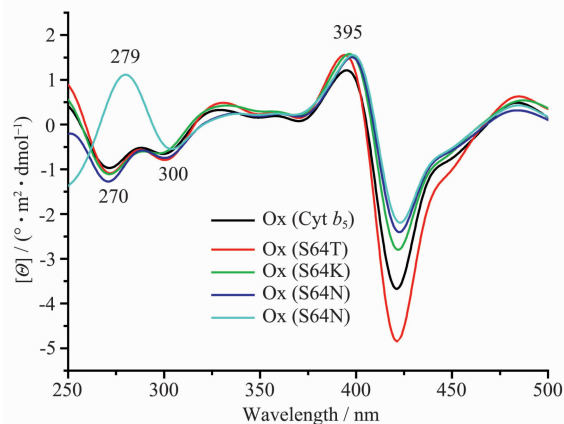


图 3 氧化态的 Cyt *b*₅ WT 及 S64X 突变体蛋白可见光区 CD 光谱

Fig.3 Comparison of visible CD spectra of Cyt *b*₅ WT and its S64X mutations in the oxidized states

2.3 稳定性

我们利用紫外可见光谱(UV-Vis)及荧光光谱监测了蛋白的热变性、酸变性和盐酸胍变性,对 Cyt *b*₅ 疏水腔中第 64 位氨基酸残基的突变对蛋白稳定性的影响进行了研究。

2.3.1 UV-Vis 光谱研究 Cyt *b*₅ 突变体的热变性

热变性是一个复杂的过程,随着温度的增加,蛋白肽链的热运动加速,溶剂分子更容易进入蛋白内部,蛋白分子内各种作用力的平衡遭到破坏,血

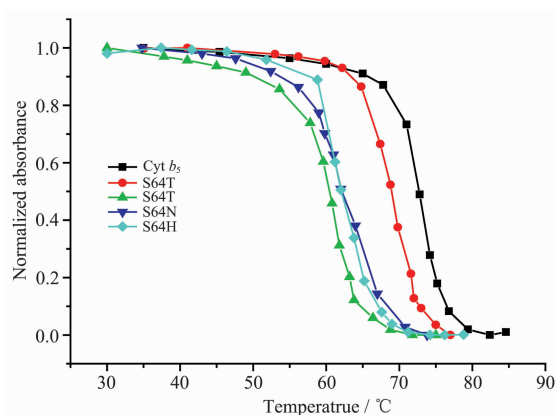


图 4 紫外可见光谱监测 Cyt b_5 WT 及 S64X 突变体蛋白的热变性中点(T_m)归一化曲线

Fig.4 Normalized curves at 413 nm for thermal denaturation midpoint (T_m) of Cyt b_5 WT and its S64X mutations

红素辅基中心铁离子与 His39/His63 的配位作用被破坏, 血红素辅基从蛋白肽链上解离下来, 在 413 nm 左右处的特征吸收峰消失。Cyt b_5 的血红素辅基和蛋白肽链解离后, 脱辅基蛋白肽链的二、三级结构不能保持, 会发生部分肽链的去折叠现象, 紫外可见光谱继续发生变化。蛋白的热稳定性不仅反映了血红素微环境的变化, 更反映了蛋白肽链整体结构受到的扰动。

实验结果表明, Cyt b_5 及突变体蛋白的热稳定性为: Cyt b_5 S64K < Cyt b_5 S64N $\approx$ Cyt b_5 S64H < Cyt b_5 S64T < Cyt b_5 WT。热力学参数见表 3。突变体 S64K、S64N 和 S64H 的变化趋势接近, 相对于野生型和突

变体 S64T 热稳定性明显降低。结合氧化还原电位结果, 我们可以发现虽然突变体 S64K 未对血红素构象产生大的影响, 但却对整个蛋白肽链结构有明显的扰动。

2.3.2 UV-Vis 光谱研究 Cyt b_5 突变体蛋白的酸变性

酸变性实验反映了血红素与轴向配体的配位情况。酸变性对含有血红素蛋白的影响主要是外加的氢离子将轴向配体 His39/His63 上的 N 原子质子化, 血红素辅基与 His39/His63 的配位作用被破坏, 血红素从蛋白肽链中解离。与此同时, 随着氢离子浓度的增加, 肽链之间的静电作用和氢键遭到破坏, 肽链重新排列。相对于热变性, 酸变性对蛋白肽链间的相互作用破坏较小, 酸变性结果主要反映的是血红素辅基与 His39/His63 配位作用, 以及氢键相互作用的变化。

表 4 列出了酸变性中点值, 可以看到突变体 S64T、S64K 的酸变性中点和野生型的在测量误差范围内基本一致。突变体 S64N 和 S64H 相对于野生型蛋白, 对酸的稳定性明显降低。除了所述的侧链对于血红素微环境的影响, 以及对血红素疏水腔口部的氢键网络的破坏, 还由于取代氨基酸残基侧链上分别有亲质子能力较强的亚氨基(组氨酸)或杂氮环(天冬酰胺), 随着酸变性过程中氢离子浓度的增大, 正电荷堆积的更快, 对血红素与 His39/His63 配位作用破坏更为迅速, 稳定性降低得更明显。

表 3 Cyt b_5 WT 及 S64X 突变体蛋白的热力学常数

Table 3 Thermodynamic data of Cyt b_5 WT and its S64X mutations

Protein	T_m / °C	ΔT_m / °C	ΔH_m / (kJ·mol ⁻¹)	ΔS_m / (kJ·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	$\Delta(\Delta G_D^{50\%})$ / (kJ·mol ⁻¹)
Cyt b_5 WT	72.8	—	405.5	1.18	—
Cyt b_5 S64T	68.9	-3.9	416.9	1.22	6.98
Cyt b_5 S64K	60.5	-12.3	436.7	1.31	15.3
Cyt b_5 S64N	62.7	-10.1	376.4	1.12	11.6
Cyt b_5 S64H	62.3	-10.5	465.1	1.39	13.5

表 4 Cyt b_5 WT 及 S64X 突变体蛋白的变性中点值

Table 4 Denaturation midpoints of Cyt b_5 WT and its S64X mutations

Denaturation midpoint	Cyt b_5 WT	Cyt b_5 S64T	Cyt b_5 S64K	Cyt b_5 S64N	Cyt b_5 S64H
pH _m ^a	3.84	3.95	3.87	4.10	4.16
C_{m1} / (mol·L ⁻¹) ^b	2.92	2.23	1.93	2.07	2.02
C_{m2} / (mol·L ⁻¹) ^c	2.73	2.22	1.92	2.15	2.01

^a midpoint of acid denaturation by UV-Vis spectra; ^b midpoint of GdnHCl denaturation by UV-Vis spectrum; ^c midpoint of GdnHCl denaturation by fluorescence spectrum.

2.3.3 UV-Vis 光谱研究 Cyt b_5 突变体的盐酸胍变性

盐酸胍变性是通过变性剂使得蛋白肽链中的各种次级键相互作用被破坏,蛋白肽链的二、三级结构发生较大变化。图 5 为紫外可见光谱监测 Cyt b_5 WT 及 S64X 突变体蛋白的盐酸胍变性中点(C_m)归一化曲线。变性中点值见表 4,可以看到 4 个突变体的盐酸胍变性中点相对于野生型蛋白的变化都较大,突变体蛋白的稳定性都有很大程度的降低。结果还表明 4 个突变体的变性中点彼此较接近,这意味着不同突变氨基酸残基对蛋白结构稳定性影响的差别并不明显。这可能是由于盐酸胍变性是对肽链整体结构的扰动,因此同一位点的不同突变体对于蛋白整体结构的影响差异不容易显现出来。

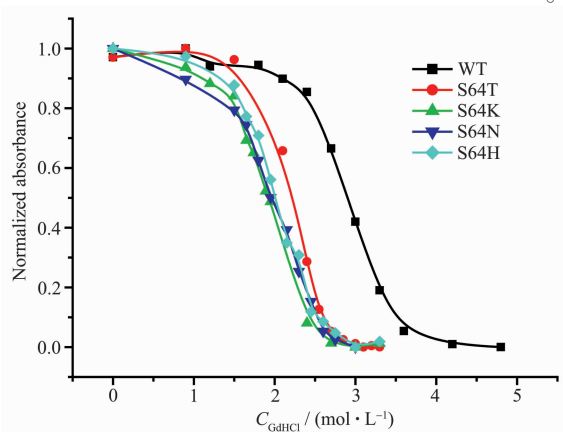


图 5 紫外可见光谱监测 Cyt b_5 WT 及 S64X 突变体蛋白的盐酸胍变性中点(C_m)归一化曲线

Fig.5 Normalized curves at 413 nm GdnHCl denaturation midpoint (C_m) of Cyt b_5 WT and its S64X mutations monitored by UV-Vis spectrum

值得注意的是:与 Cyt b_5 WT 相比,4 个 S64X 突变体蛋白盐酸胍变性中点浓度要底很多,这说明 S64X 突变体对于盐酸胍的耐受能力要弱很多,也就是说 64 位的丝氨酸对于维持整个蛋白肽链结构的稳定是非常重要的。

2.3.4 荧光光谱研究 Cyt b_5 突变体的盐酸胍变性

荧光光谱监测的是 Trp22 所处微环境的变化,由于 Trp22 和血红素之间能进行强烈的能量转移,导致荧光淬灭现象,因此荧光光谱的变化反映了蛋白构象的改变。根据荧光光谱实验结果,如图 6A 所示的 Cyt b_5 WT 随盐酸胍浓度的增大,荧光强度增大,峰值向 350 nm 处红移,表明蛋白结构变得松散,血红素环从疏水袋中脱离,Trp22 也渐渐地从疏

水环境进入水溶液。如图 6B,用荧光光谱 350 nm 处峰值的变化对盐酸胍浓度进行拟合,得到野生型细胞色素 b_5 及 S64X 突变体蛋白变性中点的盐酸胍浓度如表 4。

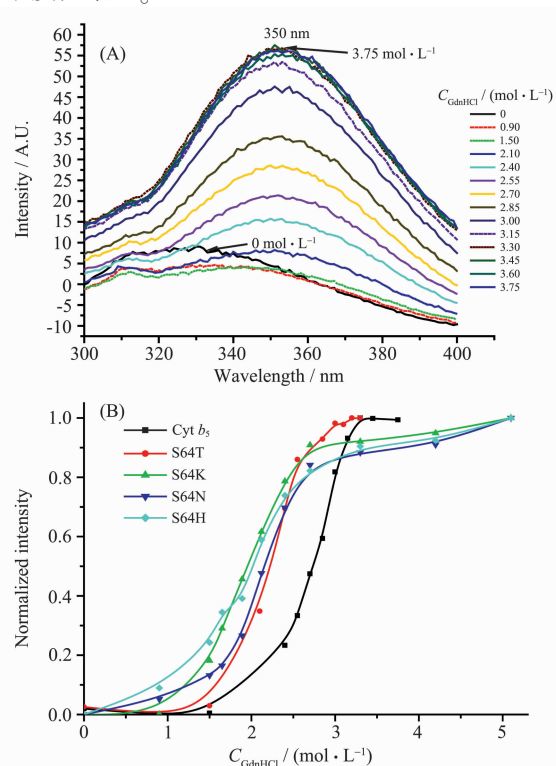


图 6 荧光光谱监测 Cyt b_5 WT(A)及 S64X 突变体蛋白的盐酸胍变性中点(C_m)归一化曲线(B)

Fig.6 GdnHCl denaturation of Cyt b_5 WT (A) & normalized curves at 350 nm of GdnHCl denaturation midpoint (C_m) of Cyt b_5 WT and its S64X mutations (B) monitored by fluorescence spectra

荧光光谱监测的盐酸胍变性结果与紫外可见光谱监测的结果一致,再次证明了 64 位丝氨酸对于 Cyt b_5 肽链的稳定性具有较大影响。

此外,如图 7 所示,我们观察到 Cyt b_5 WT 和 S64X 突变体蛋白的浓度相同时,Cyt b_5 WT 和突变体蛋白 S64T 在自然状态下荧光发射强度都很小,最大峰峰值对应的波长位于 328 和 325 nm,而突变体 S64K、S64N 和 S64H 的荧光强度都明显增强。由于色氨酸残基暴露在水溶液的程度越大,其荧光最大吸收值的能量越小,因此我们认为相对于 Cyt b_5 WT 及其保守突变体 S64T,另外 3 个非保守性突变体中 Trp22 的位置更加暴露于水溶液环境中^[13],这种极性环境的形成可能是由于二级构象的变化造成的^[14]。结合紫外光区的圆二色谱结果,我们推测在 64 位引入赖氨酸、天冬酰胺或组氨酸后,蛋白肽链

中 α -螺旋结构受到较大的扰动, 蛋白结构变得松散, 血红素腔的疏水环境受到很大的扰动。

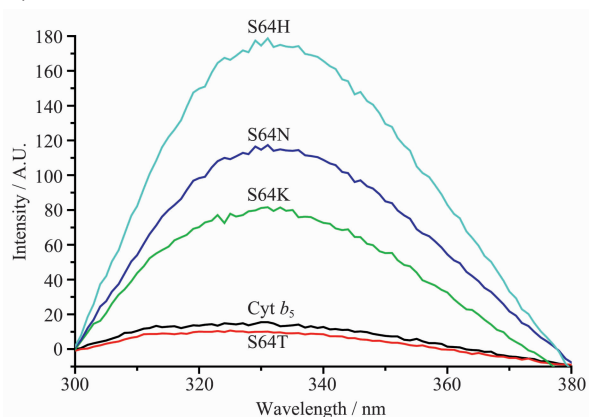


图 7 自然状态下的 Cyt b_5 WT 及 S64X 突变体蛋白的荧光光谱

Fig.7 Native Cyt b_5 WT and its S64X mutations monitored by fluorescence spectra

通过以上的研究我们可以看到, 血红素辅基 b 在细胞色素 b_5 中受到 3 种作用力的影响而被稳定: (1) His39/His63 与血红素铁离子的配位键; (2) 血红素与血红素袋中疏水残基的疏水相互作用; (3) Ser64 与血红素丙酸基的氢键。Ser64 与血红素辅基形成的氢键对于血红素构象的保持, 以及血红素疏水腔边缘的极性的保持都具有重要的影响。此外, 由于 Ser64 处于第 5 个 α -螺旋结构的 N 端, 能够与螺旋中其他氨基酸残基发生氢键作用, 对于第 5 个 α -螺旋结构的维持有着不可忽视的作用。在 64 位引入其他的氨基酸残基, 不仅会破坏血红素与肽链的结合, 更有可能破坏第 5 个 α -螺旋结构, 乃至整个蛋白肽链高级结构都会受到扰动, 蛋白的稳定性受到明显的影响。

圆二色谱实验表明, 保守性突变体 S64T 对于结构的扰动最小; 突变体 S64H 和 S64N 对蛋白肽链结构的扰动相近, 其中 S64H 的扰动要略显突出。结合紫外区的圆二色谱中突变体蛋白 S64K、S64N、S64H 的 α -螺旋结构在整个肽链二级结构中所占比例大大减少的结果, 我们推测: 由于 Ser64 正处于 H-IV 和 H-V 两螺旋结构之间, 在 64 位引入赖氨酸、天冬酰胺及组氨酸等大体积的、极性残基后, 蛋白肽链中 α -螺旋结构受到的扰动较大, 加速了对血红素辅基与血红素疏水腔中疏水残基相互作用的破坏, 这一点也为这些蛋白的荧光光谱所证实。

在热变性实验中, 温度升高会使得蛋白内的各种相互作用受到分子热运动的影响而减弱, 除保守

性突变体 S64T 以外, 其他 3 个突变体蛋白相对于野生型蛋白的稳定性明显降低。这是由于 S64K、S64N 和 S64H 这 3 个突变体蛋白 64 位氨基酸残基的体积相对较大, 取代氨基酸残基的亲水性较强, 随着温度的升高, 肽链和溶剂水分子的热运动加剧, 氨基酸残基突变所造成的空穴并没有被蛋白分子自身弛豫作用所补偿^[15], 疏水腔边缘的空穴增大, 溶剂分子更加容易进入血红素疏水腔内, 破坏蛋白分子中的相互作用力, 促使血红素辅基的解离。

酸变性实验首先影响的是血红素与轴向配体的配位, 实验表明: 64 位突变为 Thr 和 Lys 并没有太多地影响野生型细胞色素 b_5 中 Fe^{3+} -His63 的配位键, 其对蛋白肽链的扰动也相对其他 2 个突变体蛋白小一些。

盐酸胍变性的紫外-可见光谱以及荧光光谱研究着重观测疏水相互作用在蛋白结构和稳定性中的影响。这些蛋白的荧光光谱明确地表明, 在 64 位引入不同的氨基酸残基, 特别是对于非保守突变的 3 个 S64X 突变体蛋白, 对血红素疏水腔周围, 以及 Trp22 周围的肽链有明显的扰动, 蛋白结构变得松散, Trp22 暴露在极性环境中的程度加大。很显然, 盐酸胍变性的紫外-可见光谱的研究表明, 在 64 位的突变对血红素与血红素袋中疏水残基的疏水相互作用的影响要甚于其他的各种次级键。所以 Ser64 与血红素辅基形成的 2 个氢键对维系血红素与蛋白肽链结合的稳定性以及维持蛋白肽链的二、三级结构有重要作用。

3 结 论

对 Cyt b_5 Ser64 定点突变的研究表明, Ser64 与血红素辅基形成的 2 个氢键对于保持血红素腔的性质, 稳定血红素辅基具有一定的作用, 但氢键的消除和存在对于血红素与蛋白肽链结合的稳定性影响并不大, 这与前人的研究是一致的^[1]。

研究还表明: Ser64 对于 Cyt b_5 保持其肽链的二级结构起关键作用。对于维持位于 Core 1 中的第 5 个 α -螺旋结构有着重要的作用, 并有可能影响到 Core 2 的结构。因此对该位点的突变无论是保守性的还是非保守的置换, 都会使得蛋白肽链松散, 蛋白稳定性降低。这些为我们了解蛋白的性质-结构-功能间的关系提供了有用的信息。

进一步比较突变体 S64N 和 S64H 的基本性质, 可以看出它们的氧化还原电位发生了较大的变化,

且变化趋势一致;同时,CD 光谱所反映出来的二级结构的变化以及稳定性研究结果均有较为一致的变化趋势,且变化的幅度也相近。由此我们可以猜测:由于 64 引入突变氨基酸残基对于蛋白的二级结构的影响很大,使得 Core1 中的 α -螺旋结构松散,结果很有可能导致 64 位的天冬酰胺或组氨酸更易于伸向血红素疏水腔内的血红素辅基,使其有可能与血红素辅基发生配位作用,与原来的轴向配体 His63 竞争配位。对于其具体竞争机制以及对结构和性质影响还有待进一步的研究,但这无疑对蛋白结构、性质和功能的进一步研究提供了科学的思路。

参考文献:

- [1] Funk W D, Lo T P, Mauk M R, et al. *Biochemistry*, **1990**, **29**:5500~5508
- [2] Durley R C E, Mathews F S. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **1996**, **52**:65~76
- [3] Zhou H X, Pinker R J, Kallenbach N R. *Biochemistry*, **1993**, **32**:421~425
- [4] Hunter C L, Lloyd E, Eltis L D, et al. *Biochemistry*, **1997**, **36**: 1010~1017
- [5] XUE Lin-Long(薛林隆). *Thesis for the Doctorate of Fudan University*(复旦大学博士论文). **1998**.
- [6] WANG Yun-Hua(王韵华), LU Jun-Xia(陆珺霞), HUANG Zhong-Xian(黄仲贤), et al. *Chinese Science Bulletin(Kexue Tongbao)*, **2002**, **47**:1707~1710
- [7] Qian W, Wang Y H, Wang W H, et al. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2002**, **535**:85~96
- [8] Wirtz M, Oganessian V, Zhang X, et al. *Faraday Discuss*, **2000**, **116**:221~234 (discussion, 257~268)
- [9] SONG Zhan-Jun(宋占军), JIANG Hou-Li(姜厚理), GONG Yan-Dao(公衍道). *Chinese Biochemical Journal(Shengwu Huaxue Zazhi)*, **1995**, **11**(6):717~720
- [10] Mills D A, Geren G, Hiser C, et al. *Biochemistry*, **2005**, **44**: 10457~10465
- [11] Sharon M K, Nicholas C P. *Current Protein and Peptide Science*, **2000**, **1**(4):349~384
- [12] Rosell F I, Mauk A G. *Biochemistry*, **2002**, **41**(24):7811~7818
- [13] Haas W, MacColl R, Banas J A. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1998**, **1384**:112~120
- [14] Freifelder D. *Physical Biochemistry*. 2nd ed., New York: Freeman, **1982**.
- [15] Rivera M, Seetharaman R, Girdhar D, et al. *Biochemistry*, **1998**, **37**(6):1485~1494