

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2020.02.001

油松谷胱苷肽转移酶 Tau1 单体结构稳定性研究

王晓霞, 杨海灵, 毛建丰, 王晓茹*

(北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要: [目的] 探究油松 PtGSTU1 结构与功能的关系, 探讨油松 PtGSTU1 蛋白的单体稳定性。[方法] 利用同源建模模拟 PtGSTU1 的三维结构, 推测其 N 末端 18 位精氨酸 (Arg18) 和 C 末端 103 位天冬氨酸 (Asp103) 能够形成氢键来稳定蛋白单体结构。利用定点突变, 分别将 Arg18 和 Asp103 突变为具有不同极性和构象的氨基酸残基, 检测其蛋白的催化活性及结构稳定性。[结果] 6 个 Arg18 突变体均无法获得高纯度的具有正确折叠的可溶蛋白, 而 Asp103 突变体可以表达为可溶蛋白, Asp103 突变体对不同底物的催化活性和亲和力明显低于野生型, 对经典底物 CDNB 和 GSH 反应的催化速率 (V_{\max}) 降低了至少 9 倍, 对底物的催化效率 (k_{cat}/K_m) 也明显降低。[结论] Arg18 和 Asp103 之间形成的氢键对稳定 PtGSTU1 单体结构具有重要作用, 由于植物 GST 蛋白 N 端的保守性和 C 端结构域的多变性, Arg18 的突变对结构和活性的影响大于 Asp103, 同时预示着 C 端结构域中可能存在其他氨基酸位点能够与 18 位精氨酸形成氢键, 从而稳定蛋白单体折叠结构。

关键词: 酶学测定; 谷胱苷肽转移酶; 结构稳定性; 油松; 定点突变

中图分类号: S722.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2020)02-0001-08

谷胱苷肽转移酶 (Glutathione S-transferases, GSTs; EC 2.5.1.18) 是一类具有多种功能的蛋白质超家族。最早发现 GSTs 能够催化还原型谷胱苷肽 (GSH) 的巯基与异源生物和内生生物来源的各种不同结构化合物的亲电子基团结合形成 R-SG 复合物, 增加这些化合物的疏水性, 使其易于排出细胞膜, 分解之后排出体外, 从而达到解毒的作用^[1]; 其后发现 GST 还具有连接、信号转导等多种生理功能^[2], 并将具有 GSH 依赖的转移酶、过氧化物酶、异构酶和氧化还原酶以及转运功能的蛋白定义为 GST 蛋白超家族成员^[3]。基于基因的结构、蛋白序列的相似性、关键氨基酸位点的保守性、底物专一性以及免疫交叉反应等特征可将 GST 超家族成员分为多个亚家族^[4]。植物 GST 可分为 10 类: Tau、Phi、Lambda、DHAR、Theta、Zeta、EF1 β 、TCHQD、Iota 和 Hemerythrin^[5-7], 其中,

Tau 类 GST 不仅是植物特有的亚类, 也是成员最多的亚类, 参与保护细胞免受各种生物和非生物胁迫^[8-11], 以及光信号下细胞伸长和开花的调控^[12]。

Tau GST 都是以二聚体形式发挥其功能的, 单个亚基大约 23~30 kDa^[13]。每一个亚基都包含独立的催化部位, 包括一个 GSH 特异结合位点 (G 位点), 位于蛋白 N 端及 C 端结构域形成的 V 型区域表面, 和一个结合疏水底物的位点 (H 位点), 主要位于蛋白 C 端, G 位点与 H 位点由 5~10 个氨基酸残基的 linker 区连接。G 和 H 位点在结合和催化底物反应时会发生构象变化, 具有一定程度的可塑性^[14]。因此, 为了保持 GST 蛋白催化活性, 需要稳定 G 位点和 H 位点的空间结构。

本课题组前期的研究显示, 裸子植物油松 (*Pinus tabulaeformis*) 中一个 Tau 类 GST 基因 (PtGSTU1) 在油松不同组织部位均表达, 其编码

收稿日期: 2019-06-18 修回日期: 2019-12-01

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.31570664)

* 通讯作者: 王晓茹, 教授, 博士生导师, 林木群体遗传学, E-mail: wangxiaoru_bjfu@163.com

的蛋白对典型的 GST 底物 1-氯-2,4-二硝基苯 (CDNB) 和 7-氯-4-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑 (NBD-Cl) 具有高活性和较高的亲和力, 其蛋白的 Ser13、Lys40、Ile54、Glu66 和 Ser67 为谷胱苷肽结合 (G-位点) 残基, 对底物特异性和 GSH 的亲和力具有重要作用, 同时这些位点的替换能够影响蛋白的稳定性^[15-16]。本研究中, 笔者进一步探讨 PtGSTU1 的单体稳定性, 根据蛋白三维结构模拟预测出在单体结构稳定性中具有关键作用的氨基酸位点, 利用定点突变对这些位点进行氨基酸分子替换, 通过酶学功能检测, 解析这些位点对蛋白稳定性的影响。

1 材料和方法

1.1 结构模拟

本研究选取了一个油松 Tau 类谷胱苷肽转移酶为研究对象, 利用 PtGSTU1^[16]的蛋白序列 (GenBank No. AAT69969) 进行结构模拟。利用 PtGSTU1 蛋白序列在 Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) 数据库中搜索结构模板, 使用默认参数利用 SwissModel^[17] 进行结构模拟。

1.2 构建 PtGSTU1 突变体

以含有 PtGSTU1 编码序列的重组载体为模板, 通过 PCR 进行定点突变。对于 Arg 18 突变体, 利用诱变正向引物 (R18X-F) 和反向引物 (PtGSTU1-R) 进行 PCR 扩增。PCR 反应混合物含有 10 pmol

的每种引物, 1 U 的 pfx Taq DNA 聚合酶 (Invitrogen Life Technologies, USA), 0.3 mmol·L⁻¹ 的各种 dNTP (Amersham Pharmacia Biotech, USA), 1 mmol·L⁻¹ MgSO₄ 和 1~3 ng 的模板 DNA, 反应体系为 50 μL。优化的 PCR 条件为: 94℃ 下变性 2 min, 94℃ 15 s, 55℃ 退火 30 s 和 68℃ 延伸 60 s, 反应 30 个循环, 最终延伸 2 min。对于 103 位突变体, 进行两轮 PCR, 第一轮 PCR 分别用正向引物 (PtGSTU1-F) 和诱变反向引物 (D103A-R)、反向引物 (PtGSTU1-R) 和诱变正向引物 (D103A-F) 分别进行扩增, 获得 2 个片段。用 GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech, USA) 纯化第一轮反应产物。第一轮 PCR 产物在目的突变位点产生短片段重叠区段。第二轮 PCR 使用正向 (PtGSTU1-F) 和反向 (PtGSTU1-R) 引物, 以第一轮 2 个重叠的 PCR 产物为模板进行拼接。PCR 反应条件与上述相同, 所有引物见表 1。对两个突变位点的 PCR 最终产物使用 GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech) 从 1% 琼脂糖凝胶中回收 PCR 产物中的 DNA 片段。纯化的 DNA 片段和表达载体 pET30a (Novagen, Madison, WI) 分别用相应的限制性内切酶消化后进行重组。所得质粒用于转化大肠杆菌 BL21。重组载体利用 BigDye (Applied Biosystems, Foster City, CA) 进行测序验证。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物 primer	序列 sequence (5'-3')
PtGSTU1-F	TATAGGATCCATGGAGAATCAGGTTAA
PtGSTU1-R	TACTAAGCTTTTATCAGTCAGAGCCAACAA
R18I-F	TATAGGATCCATGGAGAATCAGGTTAAGGTGTTGAACTTATGGGCCAGTCC ATTTGGTCTTATCGTTTTGGTTGGATTGGAAGA
R18A-F	TATAGGATCCATGGAGAATCAGGTTAAGGTGTTGAACTTATGGGCCAGTCC ATTTGGTCTTGCGGTTTTGGTTGGATTGGAAGA
R18W-F	TATAGGATCCATGGAGAATCAGGTTAAGGTGTTGAACTTATGGGCCAGTCC ATTTGGTCTTTGGGTTTTGGTTGGATTGGAAGA
R18K-F	TATAGGATCCATGGAGAATCAGGTTAAGGTGTTGAACTTATGGGCCAGTCC ATTTGGTCTTAAGGTTTTGGTTGGATTGGAAGA
R18E-F	TATAGGATCCATGGAGAATCAGGTTAAGGTGTTGAACTTATGGGCCAGTCC ATTTGGTCTTGAGGTTTTGGTTGGATTGGAAGA
R18H-F	TATAGGATCCATGGAGAATCAGGTTAAGGTGTTGAACTTATGGGCCAGTCC ATTTGGTCTTCACGTTTTGGTTGGATTGGAAGA
D103A-R	CCATTATCATATATCTTCTTGGCTACAAAATCCGCCAAAAT
D103A-F	GCCAAGAAGATATATGATAATGG

1.3 重组 PtGSTU1 和突变体的表达和纯化

将含有重组 pET30a 质粒的大肠杆菌 BL21 过

夜培养, 然后以 1:100 稀释, 震荡培养直至光密度 (A_{600}) 达到 0.5; 加入 0.1 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导蛋

白表达,并分别在 37、25、20℃ 下继续培养 8 h; 4℃ 以 6 500 g 离心 10 min 收集菌体,重悬于结合缓冲液 (20 mmol·L⁻¹ 磷酸钠, 0.5 mol·L⁻¹ NaCl, 20 mmol·L⁻¹ 咪唑, pH 值 7.0) 中,低温超声破碎;然后将匀浆在 4℃ 下以 10 000 g 离心 10 min。通过 SDS-PAGE 分析所得沉淀和上清液。

确定成功表达可溶蛋白后,剩余的上清液上样到已用结合缓冲液预平衡的 Ni Sepharose High Performance 柱 (Amersham Pharmacia Biotech) 上。用洗脱缓冲液 (20 mmol·L⁻¹ 磷酸钠, 0.5 mol·L⁻¹ NaCl, 500 mmol·L⁻¹ 咪唑, pH 值 7.0) 洗脱与 Ni Sepharose High Performance 柱结合的目的蛋白质。使用 PD-10 柱 (Amersham Pharmacia Biotech) 对蛋白溶液进行脱盐,脱盐缓冲液为 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液 (pH 值 7.0)。

1.4 酶学活性及热稳定性测定

根据 Habig 等^[1]描述的测定方法,测定 GST 对 CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene)、ECA (ethacrynic acid) 和 4-NPA (4-nitrophenyl acetate) 底物的催化活性。利用 Ricci 等^[18]所述方法,测定对 NBD-Cl (7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole) 的催化活性。所有测定均在 25℃ 下进行。根据 Lowry 等^[19]的方法计算蛋白质浓度。使用梯度浓度 (0.1 至 1 mmol·L⁻¹) 的 GSH (glutathione) 和 1 mmol·L⁻¹ 的 CDNB 测定对 GSH 的米氏常数

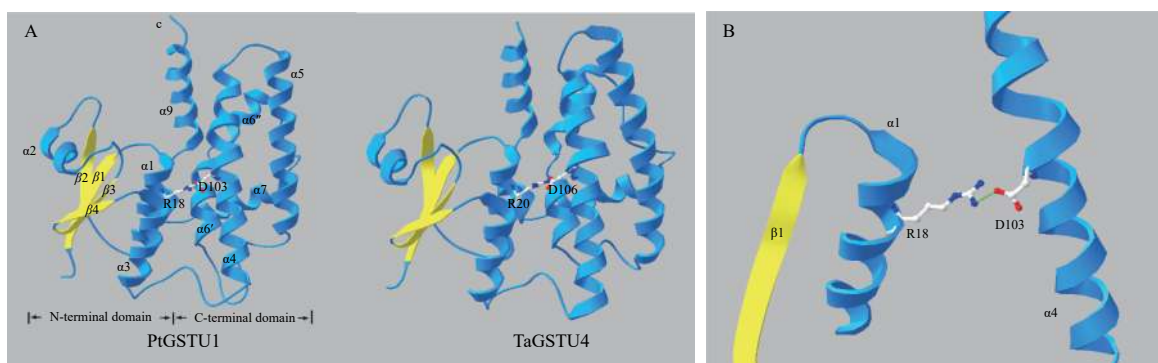
(K_m) 和酶被底物饱和时的反应速度 (V_{max})。使用梯度浓度 (0.1 至 1 mmol·L⁻¹) 的 CDNB 和 1 mmol·L⁻¹ 的 GSH 测定对 CDNB 的米氏常数 (K_m) 和酶被底物饱和时的反应速度 (V_{max})。将数据绘制为双倒数 Lineweaver-Burk 图以确定 K_m 和 V_{max} 值。

从 25~65℃,以 5℃ 间隔的温度梯度温育样品 15 min 后测定对 CDNB 的底物活性。分别对野生型 (Wild type) 和突变体 D103A (0.45 mg·mL⁻¹ 蛋白溶于 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 值 7.0) 绘制热稳定性曲线。

2 结果与分析

2.1 PtGSTU1 单体结构分析

用 PtGSTU1 蛋白序列搜索蛋白质结构数据库,获得最优模板为一个节节麦 Tau 类 GST 晶体 (TaGSTU4, PDB id 为 1 gwc)。以 TaGSTU4 晶体结构为模板进行同源建模,获得模拟的 PtGSTU1 蛋白三维结构 (图 1A)。结果发现, PtGSTU1 单体具有典型的 GST 三维结构,具有 N 端和 C 端两个结构域,其中, N 端及 C 端结构域形成的 V 字型区域表面主要为第一底物 GSH 的特异结合位点 (G 位点), C 端活性口袋包含结合疏水底物的位点 (H 位点), G 位点与 H 位点由一段短肽连接。



注: A, PtGSTU1 和 TaGSTU4 结构比较; B, PtGSTU1 蛋白 R18 和 D103 侧链形成氢键。

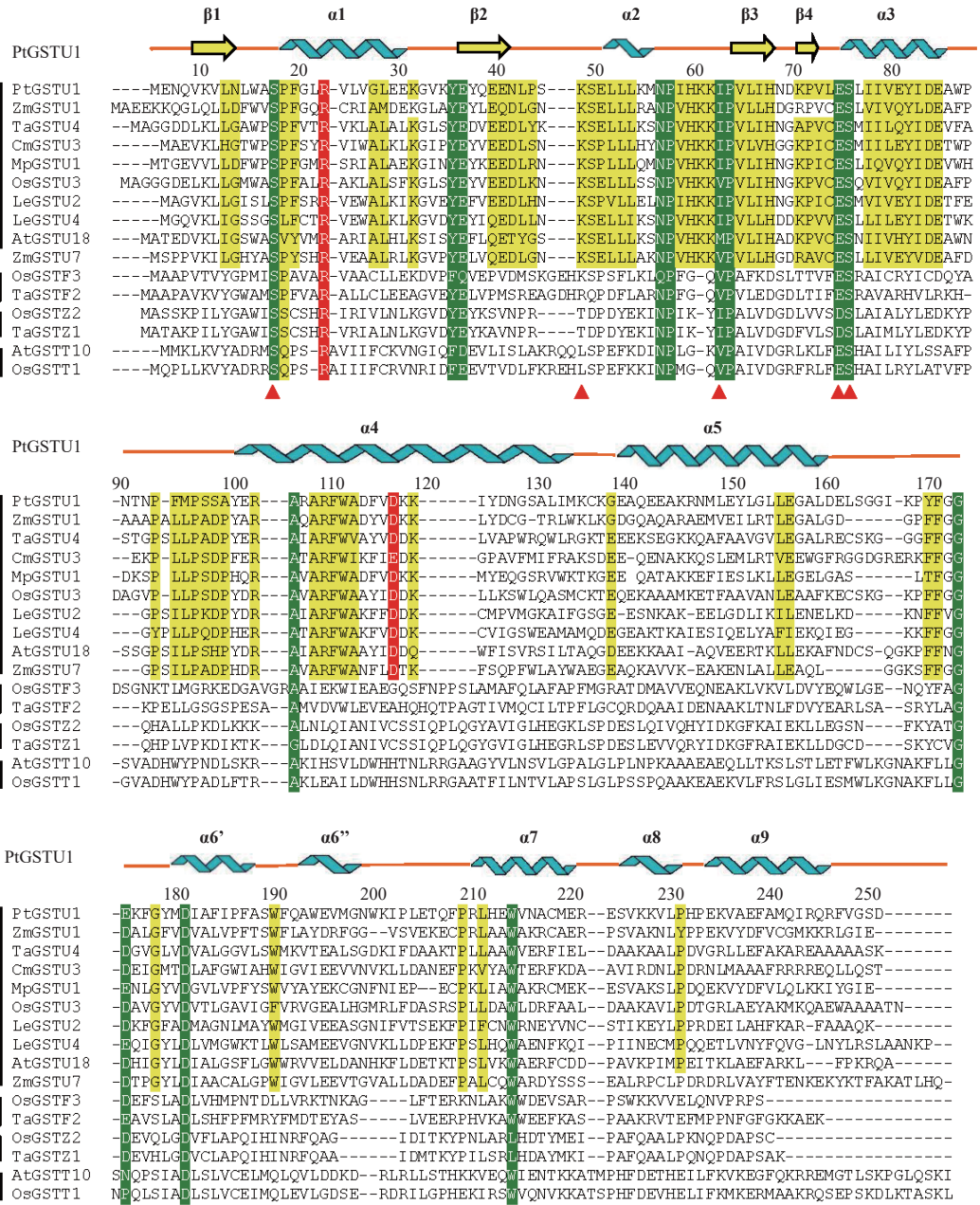
Notes: A, Comparison of the PtGSTU1 and TaGSTU4 protein structures; B, Hydrogen formed by R18 and D103 of PtGSTU1.

图 1 PtGSTU1 蛋白结构

Fig. 1 Structure of PtGSTU1

蛋白结构模型显示, N 端结构域一个精氨酸 (R) 位点能够与 C 端结构域一个天冬氨酸 (D) 形成氢键 (图 1B)。将 PtGSTU1 与不同植物、不同类型 GST 蛋白进行序列比对 (图 2), 发现

PtGSTU1 蛋白 N 端结构域的 $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ 结构在 Tau 类 GST 中非常保守, 而 C 末端的结构可变性较大。第 18 位的精氨酸在所有 GST 中均保守, 而第 103 位的天冬氨酸仅在 Tau 类 GST 中保守。



注：Pt, 油松；Zm, 玉米；Ta, 节节麦；Cm, 笋瓜；Mp, 圆叶锦葵；Os, 水稻；Le, 番茄；At, 拟南芥；红色高亮分别为形成氢键的保守氨基酸位点；红色三角是PtGSTU1的G-site活性位点。▲是PtGSTU1的G-site活性位点。

Notes: ZmGSTU1 (*Zea mays*, GenBank No. CAA73369); TaGSTU4 (*Aegilops tauschii*, PDB id 1GWCA); CmGSTU3 (*Cucurbita maxima*, GenBank No. BAC21263); MpGSTU1 (*Malva pusilla*, GenBank No. AAO61854); OsGSTU3 (*Oryza sativa*, GenBank No. AAQ02687); LeGSTU2 (*Solanum lycopersicum*, GenBank No. AAG16757); LeGSTU4 (GenBank No. AAG16759); AtGSTU18 (*Arabidopsis thaliana*, GenBank No. Q9FUS9); ZmGSTU7 (GenBank No. CAB38121); OsGSTF3 (GenBank No. AAG32477); TaGSTF2 (GenBank No. CAD29475); OsGSTZ2 (GenBank No. AAK98533); TaGSTZ1 (GenBank No. O04437); AtGSTT10 (GenBank No. CAA10457); OsGSTT1 (GenBank No. AAK98534); The amino acids that form hydrogen bonds are shaded in red; the G-site of PtGSTU1 is marked with red triangles, the G-site of PtGSTU1 is marked with ▲.

图 2 植物 GST 蛋白序列比对
Fig. 2 Alignment of plant GST proteins

2.2 PtGSTU1 及其突变体蛋白的表达

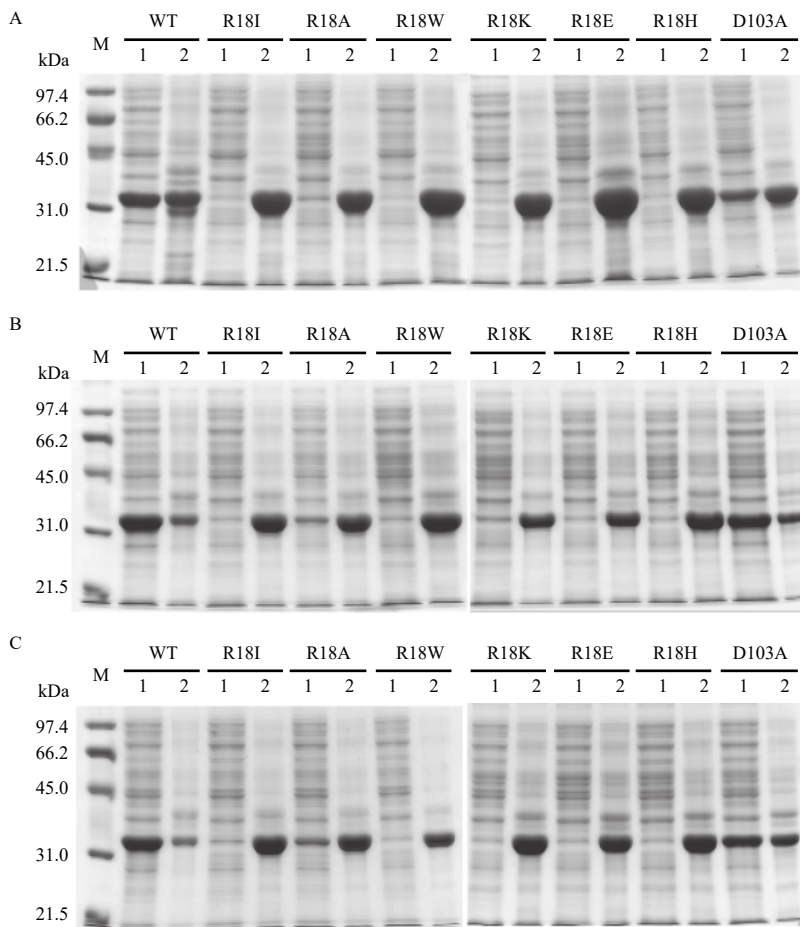
为了探讨 PtGSTU1 蛋白 R18 和 D103 位之间氢键对蛋白结构稳定性的影响，笔者对这 2 个位点分别单独进行了定点突变。将 18 位精氨酸分别突

变为异亮氨酸 (I)、丙氨酸 (A)、色氨酸 (W)、赖氨酸 (K)、谷氨酸 (E) 和组氨酸 (H)，构建了 R18I、R18A、R18W、R18K、R18E 和 R18H 六个突变体蛋白，并将 103 位天冬氨酸突变为丙氨酸

(A) 构建 D103A 突变体。这些用于替换的氨基酸残基侧链具有不同的极性和空间位阻。

对野生型 PtGSTU1 和所有突变体进行蛋白的表达检测 (图 3), 分别在 37、25、20°C 进行蛋白的诱导表达, 对收集的菌体进行破碎, 破碎后分离细胞沉淀物和上清, 进行 SDS-PAGE 检测。检

测结果显示: 野生型和突变体蛋白分子量在 32 kDa 左右, 与预期一致。在 37°C 下, 6 个 R18 突变体均为包涵体, 而野生型和 D103A 在上清中表达。在 25°C 和 20°C 下, R18A 在上清检测到微弱的表达, 其他 5 个 R18 突变体均为包涵体, 野生型和 D103A 在上清中表达。



注: A、B、C 分别为 37°C、25°C 和 20°C 下诱导蛋白表达的结果; M, 标准蛋白; 1, 上清; 2, 沉淀。

Notes: A, B, and C are expression of recombinant proteins under 37°C, 25°C and 18°C respectively; M, protein marker; 1, supernatant after ultrasonication and centrifugation of cells expressing recombinant proteins; 2, cell pellet after ultrasonication and centrifugation of cells expressing recombinant proteins.

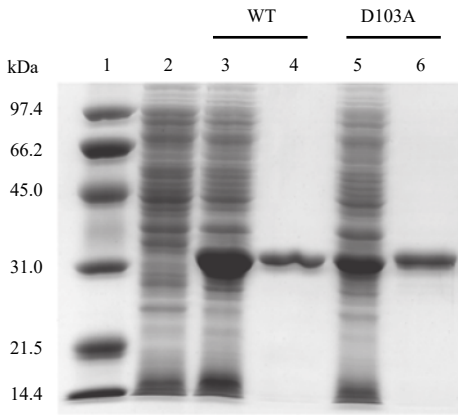
图 3 PtGSTU1 及其突变体蛋白表达

Fig. 3 Expression of the wild type and mutants of PtGSTU1

在细胞沉淀中的蛋白多为由膜包裹的高密度、不溶性蛋白质颗粒, 因此, 6 个 R18 突变体无法获得高纯度的具有正确折叠的可溶蛋白。为了检测 D103 突变体的酶学功能变化, 笔者分别对野生型和 D103A 突变体蛋白进行纯化, 利用 Ni 离子亲和柱纯化上清中表达的蛋白, 以野生型蛋白为参照, 纯化后, 重组蛋白均显示单一条带, 在 SDS-PAGE 上具有相同的迁移率 (图 4)。

2.3 PtGSTU1 及其突变体酶学功能测定

PtGSTU1 蛋白 R18 位 6 个突变体的表达检测显示: 仅 R18A 有微量蛋白能够在上清中表达, 但由于表达量过低, 纯化后无法获得高浓度可溶蛋白进行酶学功能的检测。为了检测突变体是否还具有 GST 催化活性, 笔者以含有 pET30a 载体的 B121 诱导表达后的上清液为阴性对照, 测定 R18A 重组蛋白表达上清对 CDNB 的催化活性, 结果显示:



注: 1, 标准蛋白; 2, pET30a 载体; 3、5, 上清;
4、6, 纯化后蛋白。

Notes: 1, protein marker; 2, negative control; 3 and 5, supernatant after ultrasonication and centrifugation of cells expressing recombinant proteins; 4 and 6, purified recombinant proteins.

图4 PtGSTU1 及 D103A 突变体蛋白纯化

Fig. 4 Expression of the wild type and mutant D103A of PtGSTU1

R18A 具有微弱的催化活性 ($OD_{340} = 0.02$)。

对纯化后的 D103A 重组蛋白进行酶学活性检测发现: 103 位天冬氨酸突变为丙氨酸后, 其对 4 种底物的活性明显降低, 对 CDNB 的催化活性仅为 $(1.70 \pm 0.26) \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, 与野生型相比降低了 12.2 倍; 对 NBD-Cl 的催化活性为 $(0.45 \pm 0.08) \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, 与野生型相比降低了 10.7 倍, ECA 降低 1.1 倍, 对 4-NPA 几乎检测不到催化活性 (表 2)。

CDNB 是 GST 经典底物, 广泛用于 GST 活性的检测, 且 PtGSTU1-D103A 对 CDNB 的催化活性最高。我们使用 CDNB 和 GSH 作为底物测定 PtGSTU1-D103A 的动力学常数。发现 PtGSTU1-D103A 对两个底物的米氏常数 (K_m) 均有明显增加, 分别为 $1.06 \pm 0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.87 \pm 0.17 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这意味着与野生型相比, PtGSTU1-D103A 对底物的亲和力明显降低。底物饱和时, PtGSTU1-D103A 催化 GSH 和 CDNB 的反应速率 (V_{\max}) 降低了至

表 3 PtGSTU1 野生型和 D103A 突变体蛋白动力学。

Table 3 Steady-state kinetic constants of the wild type and D103A mutant of PtGSTU1. Data are means \pm S.D, calculated from three replicates.

GST	GSH				CDNB			
	K_m / mmol	$V_{\max} / (\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1})$	$k_{\text{cat}} / \text{min}^{-1}$	$k_{\text{cat}}/K_m / (\text{min}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1})$	K_m / mmol	$V_{\max} / (\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1})$	$k_{\text{cat}} / \text{min}^{-1}$	$k_{\text{cat}}/K_m / (\text{mmol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$
Wild type ¹	0.76 ± 0.13	182.2 ± 22.1	404.9	532.8	0.47 ± 0.06	174.9 ± 16.7	388.7	827.0
D103A	1.06 ± 0.25	18.1 ± 1.4	27.4	25.8	0.87 ± 0.17	11.2 ± 1.3	17.0	25.7

少 9 倍。相应的, 对底物的催化效率 (k_{cat}/K_m) 也明显降低 (表 3)。

2.4 PtGSTU1 及其突变体热力学稳定性分析

为了进一步验证 R18 和 D103 这 2 个氨基酸位点间氢键对 Tau 类 GST 蛋白单体结构的影响, 笔者分别对野生型和 PtGSTU1-D103A 蛋白的热力学稳定性进行检测。野生型蛋白在 25~50℃ 之间保留了 90% 以上的催化活性, 这表明其在 50℃ 以下是稳定的; 而 PtGSTU1-D103A 突变体蛋白随温度升高, 催化活性快速降低, 在 30℃ 时仅剩约 40% 的催化活性, 预示着其蛋白热稳定性较低 (图 5)。

表 2 PtGSTU1 野生型和 D103A 突变体蛋白底物活性

Table 2 Specific activities of the wild type and D103A mutant of PtGSTU1 towards different substrates. The values shown are means \pm S.D., calculated from three replicates

GST	底物活性 Specific activity/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1})$			
	CDNB	ECA	NBD-Cl	4-NPA
Wild type ¹	22.50 ± 1.43	1.77 ± 0.29	5.27 ± 0.33	0.05 ± 0.01
D103A	1.70 ± 0.26	0.84 ± 0.13	0.45 ± 0.08	<0.001

¹数据来源于文献[15]。下同。

¹Data from [15]. The same blow.

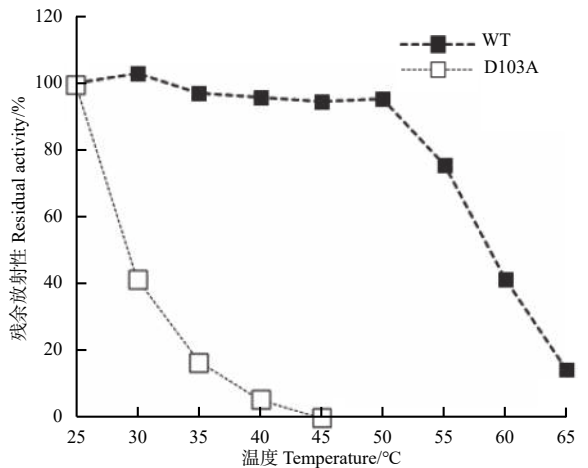


图 5 PtGSTU1 及 D103A 突变体蛋白的热力学稳定性

Fig. 5 Thermal stability of the recombinant wild type and mutant D103A of PtGSTU1

3 讨论

基于与节节麦 TaGSTU4 蛋白晶体结构的比较, 笔者推测 PtGSTU1 的 18 位精氨酸和 103 位天冬氨酸能够形成氢键, 这个氢键稳定了蛋白 N 端和 C 端的空间结构, 使蛋白能够形成正常的折叠。PtGSTU1 的催化口袋位于 N 端和 C 端的空间结构之间^[16], 第 18 位精氨酸位于 α_1 螺旋上, 这一位点在植物不同类型 GST 序列中均保守。PtGSTU1 蛋白 G-site 活性位点 13 位的丝氨酸对 GST 蛋白活性至关重要^[15-16], 位于 α_1 螺旋末端, α_1 螺旋空间结构的改变将直接影响 G 位点与第一底物 GSH 的结合。

精氨酸为碱性氨基酸, 其带正电, 具有 $-(\text{CH}_2)_3\text{-NH-CN-H-NH}_2$ 的长侧链, 能在空间上最大限度接近位于 C 端 α_4 螺旋上的 103 位天冬氨酸, 与天冬氨酸侧链上的 $-\text{COOH}$ 形成 $\text{N-H}\cdots\text{O}$ 型氢键。将 18 位的精氨酸突变为赖氨酸时 (R18K), 虽然其侧链具有 4 个碳原子长链, 能够接近 C 端结构域, 但由于极性降低 (R, $pK_a=12.0$; K, $pK_a=10.5$), 影响了氢键形成。R18H 突变体的 18 位精氨酸侧链被组氨酸咪唑基取代, 不仅极性降低 (H, $pK_a=6.08$), 且侧链长度变短。此外, 当突变为异亮氨酸 (I) 和丙氨酸 (A) 时, 侧链上的氨基被甲基取代, 同时影响了该位点的电负性和空间结构。突变为谷氨酸 (E) 时, 侧链为 $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$, 该位点由碱性氨基酸变为带负电的酸性氨基酸, 破坏氢键形成。当突变为色氨酸 (W) 时, β -吡啶基增加了 $-\text{N-H}$ 与 103 位天冬氨酸形成氢键的位阻。对突变体蛋白的表达分析显示, 无论将 18 位精氨酸突变为碱性还是酸性氨基酸, 均会影响蛋白的正确折叠, 因此, 所有 R18 突变体蛋白均表达为包涵体, 尽管 R18A 在上清中检测到微弱表达, 其活性也远低于野生型。这预示着在植物 GST 中, 18 位精氨酸可能是稳定单体结构的关键氨基酸之一。

与在植物中极为保守的 18 位精氨酸相比, 103 位天冬氨酸仅在 Tau 类 GST 中保守。将天冬氨酸 $-\text{CH}_2\text{-COOH}$ 侧链替换为 $-\text{CH}_3$ 时, 虽然失去了强极性的氧原子, 但依然能够形成正确的蛋白折叠; 但其底物活性相较于野生型明显降低, 对底物的亲和力降低了将近 1 倍, 催化效率降低近 10 倍, 预示着这一位点的突变可能影响了活性位点的空间结构。同时, 热力学稳定性检测也验证了, D103A

突变体的稳定性明显低于野生型。说明, 尽管 103 位天冬氨酸能够参与形成氢键, 但它的突变并不会使蛋白完全失活, 而是明显降低其的催化能力和稳定性。这不仅印证了 GST 蛋白 C 端结构域的多变性, 同时预示着 C 端结构域中可能存在其他氨基酸位点能够与 18 位精氨酸形成氢键, 从而稳定蛋白单体折叠结构。

4 结论

本研究通过对油松 PtGSTU1 野生型和突变体的酶学功能检测发现, N 末端 18 位精氨酸 (Arg18) 和 C 末端 103 位天冬氨酸 (Asp103) 形成的氢键对稳定蛋白单体结构具有重要作用。由于植物中 GST 蛋白 N 端结构域具有保守性, C 端结构域具有多变性, Arg18 的突变对单体稳定性的影响大于 Asp103, 表明 C 端结构域中可能存在其他氨基酸位点能够与 18 位精氨酸形成氢键, 从而稳定蛋白空间结构。

参考文献:

- [1] Habig W H, Pabst M J, Jakoby W B. Glutathione S-Transferases[J]. J Biol Chem, 1974, 249(22): 7130-7139.
- [2] Sappl P G, Carroll A J, Clifton R, et al. The *Arabidopsis* glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress[J]. The Plant journal: for cell and molecular biology, 2009, 58(1): 53-68.
- [3] Edwards R, Dixon D P. Plant glutathione transferases[J]. Methods Enzymol, 2005, 401: 169-186.
- [4] Frova C. The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution[J]. Physiol Plant, 2003, 119(4): 469-479.
- [5] Jain M, Ghanashyam C, Bhattacharjee A. Comprehensive expression analysis suggests overlapping and specific roles of rice glutathione S-transferase genes during development and stress responses[J]. BMC Genomics, 2010, 11(1): 73.
- [6] Dixon D P, Edwards R. Glutathione transferases[J]. The Arabidopsis book, 2010a, 8(e0131).
- [7] Liu Y J, Han X M, Ren L L, et al. Functional divergence of the glutathione S-transferase supergene family in *Physcomitrella patens* reveals complex patterns of large gene family evolution in land plants[J]. Plant Physiol, 2013, 161(2): 773-786.
- [8] Frova C. Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives[J]. Biomol Eng, 2006, 23(4): 149-169.
- [9] McGonigle B, Keeler S J, Lau S M, et al. A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family

- in soybean and maize[J]. *Plant Physiol*, 2000, 124(3): 1105-1120.
- [10] Loyall L, Uchida K, Braun S, *et al.* Glutathione and a UV light-induced glutathione S-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures[J]. *The Plant cell*, 2000, 12(10): 1939-1950.
- [11] Ezaki B, Suzuki M, Motoda H, *et al.* Mechanism of gene expression of *Arabidopsis* glutathione S-transferase, AtGST1, and AtGST11 in response to aluminum stress[J]. *Plant Physiol*, 2004, 134(4): 1672-1682.
- [12] Chen I C, Huang I C, Liu M J, *et al.* Glutathione S-transferase interacting with far-red insensitive 219 is involved in phytochrome A-mediated signaling in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2007, 143(3): 1189-1202.
- [13] Dixon D P, Cole D J, Edwards R. Dimerisation of maize glutathione transferases in recombinant bacteria[J]. *Plant molecular biology*, 1999, 40(6): 997-1008.
- [14] Neufeind T, Huber R, Dasenbrock H, *et al.* Crystal structure of herbicide-detoxifying maize glutathione S-transferase-I in complex with lactoylglutathione: Evidence for an induced-fit mechanism[J]. *J Mol Biol*, 1997a, 274(4): 446-453.
- [15] Zeng Q Y, Lu H, Wang X R. Molecular characterization of a glutathione transferase from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae)[J]. *Biochimie*, 2005, 87(5): 445-455.
- [16] Zeng Q Y, Wang X R. Catalytic properties of glutathione-binding residues in a tau class glutathione transferase (PtGSTU1) from *Pinus tabulaeformis*[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(12): 2657-2662.
- [17] Schwede T, Kopp J, Guex N, *et al.* SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(13): 3381-3385.
- [18] Ricci G, Caccuri A M, Lo Bello M, *et al.* Colorimetric and fluorometric assays of glutathione transferase based on 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazole[J]. *Anal Biochem*, 1994, 218(2): 463-465.
- [19] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. *J Biol Chem*, 1951, 193(1): 265-275.

Monomer Structural Stability of a Tau Class Glutathione Transferase (PtGSTU1) from *Pinus tabulaeformis*

WANG Xiao-xia, YANG Hai-ling, MAO Jian-feng, WANG Xiao-ru

(College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: [Objective] To study the relationship between structure stability and function of PtGSTU1. [Method] Homology modeling was used to simulate the three-dimensional structure of PtGSTU1. It is proposed that arginine (Arg18) in N-terminal domain and aspartic acid 103 (Asp103) in C-terminal domain are capable of forming a hydrogen bond to stabilize the protein monomer structure. Arg18 and Asp103 were mutated to amino acid residues with different polarities and conformations, respectively, using site-directed mutagenesis, and the catalytic activity and structural stability of the mutants were examined. [Result] None of all the six Arg18 mutants could obtain high-purity soluble protein with the correct folding, while Asp103 mutant could be expressed as a soluble protein whose catalytic activity and structure stability to different substrates were significantly lower than those of the wild type. The catalytic rate (V_{\max}) of Asp103 mutant to classical substrates CDNB and GSH was reduced by 8/9 at least, and the catalytic efficiency ($k_{\text{cat}} / K_{\text{m}}$) to the substrate was also significantly reduced. [Conclusion] The results proves that as the C-terminal domains are more variable than N-terminal domains in plant GST proteins, there may be some other amino acid sites in the C-terminal domains that can form hydrogen bonds with the arginine to stabilize the protein monomer.

Keywords: enzyme assay; glutathione transferase; structural stability; *Pinus tabulaeformis*; site-directed mutagenesis

(责任编辑: 张 研)