

# 脯氨酸对蛋白质热稳定性的贡献

朱国萍<sup>1,3</sup> 滕脉坤<sup>1,2</sup> 王玉珍<sup>1</sup>

(中国科学技术大学生命科学院分子生物与细胞生物学系<sup>1</sup>

中国科学院中国科学技术大学结构生物学开放实验室<sup>2</sup> 合肥 230026)

**摘要** 单一氨基酸的置换可以改变酶的热稳定性。脯氨酸(Pro)残基在蛋白质结构及其热稳定性中具有特殊作用。它十分偏爱 $\beta$ -转折或无规卷曲结构,而很少出现在 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠中。分析认为在改善酶热稳定性的蛋白质工程中,只要主链构象不发生骤变,则可在适当的 $\beta$ -转折或无规卷曲中引入Pro,通过其刚性的吡咯烷环,降低蛋白质去折叠时的骨架熵,从而使其周围的构象更合理。这一Pro理论(the proline theory)的分子设计新思路将会得到进一步的发展和完善。

**关键词** 脯氨酸 二级结构 热稳定性 蛋白质工程

热稳定性(thermostability)是蛋白质分子所有共价和非共价结合力的一个复杂的综合效应,包括疏水作用、包装效率、盐键及氢键、共价键的稳定、降低构象变化、降低去折叠熵以及 $\alpha$ -螺旋、环等二级结构的稳定<sup>[1]</sup>。在20种氨基酸中,目前仍不清楚究竟是哪种关键残基控制着蛋白质的温度敏感性,因此通过蛋白质工程获得性质改善的酶,至今没有百发百中的分子设计手段。但脯氨酸(Proline, Pro)以其独特的结构优势越来越显示出它对蛋白质热稳定性的重要作用。

## 1 Pro 在蛋白质二级结构中的作用

### 1.1 Pro 的结构特点

Pro 包含一氨基一羧基及一个吡咯烷环(pyrrolidine ring)侧链。由于其N-原子位于吡咯烷环上,使得C-N单键不能旋转,因而不可能形成 $\alpha$ -螺旋所需的 $\phi$ 角;加上Pro没有N-H基,其侧链又阻止自身C=O基接近主链骨架的N-H基,即不能生成维持 $\alpha$ -螺旋构象所需的氢键,因此Pro是 $\alpha$ -螺旋的最大破坏者<sup>[2]</sup>。在多肽链中,Pro不仅限制自身的( $\phi$ ,  $\psi$ )值,也限制前一个氨基酸的( $\phi$ ,  $\psi$ )值<sup>[3]</sup>。Pro的N-C旋转受到吡咯烷环的束缚,因而具有更小的构象自由度(conformational freedom),且限定随后的氨基酸在有限的空间中,说明Pro的引入可以减低蛋白质去折叠(unfolding)时的骨架熵(entropy)<sup>[4]</sup>。

### 1.2 Pro 与 $\beta$ -转折结构

$\beta$ -转折( $\beta$ -turn)是维持蛋白质各种二级结构的空间相对位置和稳定三级结构的必不可少元素。

Levitt在对20种氨基酸在近百种蛋白质二级结构中出现频率的统计显示,Pro比其它氨基酸更适合位于 $\beta$ -转折的第二位点或无规卷曲(random coil)的拐角(corner)处<sup>[2]</sup>。由于Pro能在自身处与多肽链发生急剧弯折(sharply bend),使得肽链骨架更易与其它转折处的氨基酸的极性侧链形成氢键,因此可以通过降低肽链骨架的柔性(flexibility)而使弯折结构更加稳定、牢固。另外Pro的疏水侧链可与邻近的疏水洞穴(hydrophobic cavity)相互作用。疏水基团的紧密包裹使 $\beta$ -转折或无规卷曲结构中的各种键合更牢固,从而进一步增强蛋白质空间结构的稳定性<sup>[4]</sup>。因此 $\beta$ -转折中的Pro能通过加强蛋白质内部结构的疏水性来改善热稳定性。

## 2 Pro 对蛋白质热稳定性的贡献

嗜热酶和嗜温酶具有许多共同点<sup>[1]</sup>: (1) 40%~85%的序列相似性; (2) 立体结构的可迭合(superposable)性; (3) 相同的催化机制,并且嗜热酶都能在嗜温菌中表达而性质不变,说明热稳定性是其内在本质。因此同源性较高的蛋白质却有着天壤之别的性质,是由于某些关键氨基酸残基的差异造成的。

### 2.1 1.6-寡葡糖苷酶

Suzuki等人比较了5种1.6-寡葡糖苷酶的序列<sup>[4]</sup>,发现它们的热稳定性呈线性升高,平行递增的摩尔百分比为54.5 58.3 60.5 62.0 64.6。它们从低到高分别为嗜温菌 兼性嗜温菌 嗜热菌 专性嗜热菌 极端嗜热菌。根本原因是它们空间

构象的稳定性不同。它们序列中的 Pro 含量呈线性增长,摩尔百分比为 2.37 4.63 5.67 6.79 8.52,结果结构中的  $\alpha$ -螺旋含量下降, $\beta$ -折叠和回折结构的含量几乎不变,但参与疏水作用的氨基酸数量增加,加强了酶的疏水核心作用。

Watanabe 等仔细研究了嗜温菌 *B. cereus* 及嗜热菌 *B. thermoglucosidasius* 所产的 1,6-寡葡糖苷酶在一级结构和空间结构上的差异<sup>[5]</sup>。两者的序列同源率为 72%,但嗜热菌酶远比嗜温菌酶热稳定。主要因为两者所含 Pro 的数量及空间分布不同。两种酶都含有 18 个保守 Pro 以维持一般的折叠构象,但嗜热菌酶还含有 14 个在立体结构中排布独特、保守的额外 Pro (extra Pro): 6 个在 N-末端结构域; 3 个在亚结构域(subdomain); 3 个在 C-末端结构域; 1 个位于 N、C 两末端结构域的交界处; 1 个位于 C-末端。其中有 11 个分布于  $\beta$ -转折或无规卷曲里。尤其是 9 个位于 N 末端结构域和亚结构域中的 Pro, 有 7 个分布在  $\beta$ -链与相邻的 8 ( / ) 筒(barrel) 的  $\alpha$ -螺旋之间的环上。这些环构成酶的活性位点裂缝(active site cleft)。这 7 个 Pro 降低了裂缝的柔性,使其更趋于稳定。正是这些额外 Pro 的存在,增加了整个空间结构的刚性(rigidity),从而赋予嗜热菌酶极高的热稳定性。

## 2.2 葡萄糖异构酶

自然界中的葡萄糖异构酶(GI)在高温下都相当稳定。嗜热高温菌 GI 是迄今发现的热稳定性最高的 GI。该酶在 70 °C 保温 30 天后,活性能 100% 维持,而链霉菌 GI 只存留 25%,大肠杆菌 GI 的热稳定性则更差。Dekker 等通过对 GI 氨基酸序列比较后认为,它们的热稳定性差异是嗜热高温菌对某些氨基酸残基偏爱选择的结果,而这些氨基酸在其他 GI 中则被替代,如 Gly Pro 等<sup>[6]</sup>。

## 2.3 色氨酸合成酶

为研究 Pro 的特殊作用,Yutani 等构建了 *E. coli* 色氨酸合成酶的  $\beta$ -亚基的 6 个突变体,即由 Gly 和 Ala 取代 6 个十分保守的 Pro<sup>[7]</sup>。除 P57A 的性质与野生型一致外,其他突变体的热稳定性均降低。Pro<sup>28</sup>稳定亚基的 1 和 2 结构域间的相互作用,Pro<sup>207</sup>则维持亚基的完整结构,当被柔性较大的 Gly 和 Ala 取代后,导致螺旋-6 崩解。说明这些位点的 Pro 对该酶的稳定起关键作用。

## 2.4 其他酶类

Tagaya 的实验显示在鸡腺苷酸激酶(adenylate kinase)中,Pro<sup>[7]</sup>恰巧位于小肽段 Thr<sup>14</sup>-Gly-Gly-

Pro-Gly-Ser-Gly-Lys-Gly<sup>22</sup>的转折位置,形成一个可动性环,并稳定该酶的性质<sup>[8]</sup>。Takagi 的研究认为位于  $\alpha$ -螺旋 C-末端的 Pro<sup>239</sup>对枯草杆菌蛋白酶 E 的催化效应及热稳定性至关重要<sup>[9]</sup>。另外在某些蛋白质中常含有 Pro 的串联重复片段,如(AAKP)<sub>n</sub>、(KKSP)<sub>n</sub> 或(TTTKP)<sub>n</sub>,这些重复单位总伴随 Pro 的自我弯折而构成螺旋卷曲结构。Pro 纽结的螺旋(proline-kinked helices)能够加强与序列中 Ala 或 Lys 的相互作用<sup>[10]</sup>。Pro 的数量与蛋白质热稳定性呈正相关的还有亮氨酸脱氢酶、支链淀粉酶等<sup>[5]</sup>。

## 3 Xaa Pro 置换在改善热稳定性的蛋白质工程中的应用

自然界中一些热稳定蛋白质的序列,往往暗示着某些位点的置换可以提高其他同源蛋白质的热稳定性<sup>[11]</sup>。为获得有意义的突变体,一般考虑:(1) 改变亚基间静电相互作用强度;(2) 增添邻近残基间氢键数目;(3) 减少蛋白质折叠过程的自由能;(4) 增加有助于二级结构稳定的因素等<sup>[12]</sup>。

### 3.1 T4 噬菌体溶菌酶

美国 Oregon 大学的 Matthews 以噬菌体 T4 溶菌酶为模型,研究了上百个突变分子<sup>[13]</sup>。其中 A82P 突变体酶的热稳定性远远高于野生型酶。由于 Pro 的吡咯烷环限制了链的摆动性,这样在蛋白质折叠过程中,就无需耗费太多的自由能去限制此处的构型。同时 Pro 的 N-原子与肽链中的 C 原子牢固键合,使 Pro<sup>82</sup>所在的  $\beta$ -转折结构更趋于稳定而使酶热稳定性提高。他们认为 Xaa Pro 或 Gly Xaa 的置换将会降低蛋白质去折叠时的骨架构型熵,且在结构的刚性部分(rigid parts) 引进新的分子内作用力,从而提高热稳定性。

### 3.2 丝氨酸蛋白水解酶

同源蛋白的序列比较有助于合理地选择突变位点。Masui 比较了 6 种丝氨酸族蛋白水解酶的氨基酸序列<sup>[14]</sup>,如丝氨酸蛋白酶 AprM,枯草杆菌蛋白酶 E、EPN 及 Carlsberg 型等。它们的同源性高达 70%。在 BPN 型中,Gln<sup>206</sup>-Ser-Thr-Leu<sup>209</sup>形成一个  $\beta$ -折叠,Pro<sup>210</sup>-Gly-Asn<sup>212</sup>形成一个逆向  $\beta$ -折叠(reversed  $\beta$ -sheet),Pro<sup>210</sup>正位于两个  $\beta$ -折叠转折处。相对应 Pro<sup>210</sup>的位置上,除 AprM 是 Thr<sup>203</sup>外,其余蛋白酶均为 Pro。于是他们将 AprM 中  $\beta$ -折叠端的 Thr 突变为 Pro。结果突变体酶在 70 °C 的活性是野生型酶的 105%,在 80 °C、30min 后,其活性还存留 50%,而野生型酶只剩 10%。显然 Pro<sup>203</sup>使分子结构更合理化,明显提高了热稳定性。

### 3.3 中性蛋白酶

嗜热芽胞杆菌中性蛋白酶由 319 个氨基酸组成,在其活性位点处有一段连接 N-端和 C-端结构域的  $\alpha$ -螺旋(140 ~ 153 aa)。Nakamura 在 140 和 141 位点引入 Pro,结果 II40P 和 D141P 的半存活温度分别由 68.3 提高至 75.8 和 71.1,  $T_m$  也分别提高 4.4 和 2.3。通过计算发现,Pro 使  $\alpha$ -螺旋发生有限的扭转( $< 11^\circ$ )。Pro<sup>140</sup>和 Pro<sup>141</sup>的  $\phi$ 角分别旋转( $-7.5^\circ$ )和( $-0.2^\circ$ ),从而影响前后残基的空间位置发生相应变化,使活性中心的包裹更紧密,改善了酶的热稳定性<sup>[15]</sup>。

### 3.4 葡萄糖异构酶

7 号淀粉酶链霉菌 M1033 GI 的突变体 GI38P 及双点突变体 GI38P-G247D,热失活半衰期分别延长近 1 倍和 2.5 倍<sup>[16,17]</sup>。晶体结构显示 Gly<sup>138</sup>位于一段无规卷曲中。将 Gly<sup>138</sup>替换为 Pro<sup>138</sup>后,Pro 的吡咯烷环刚好能够充填 Gly 由于无侧链基因而留下的空洞,使得整个分子结构更紧密、合理。对已知 19 种 GI 的氨基酸序列比较发现,Gly 在其它 18 种 GI 中全都保守,但在嗜热高温菌 GI 的同源性部位,即 137 位恰恰是 Pro。对于蛋白质数据银行(PDB)的其它几种 GI 结构模型,如锈赤链霉菌 GI、节杆菌 NRRL B3728 GI 等,均显示 Pro<sup>138</sup>在它们的结构中也可能产生类似的好效果。

### 3.5 青霉素酶

Imanaka 研究小组将抑制青霉素酶基因表达的阻遏蛋白(PenI)的  $\alpha$ -转折处 Pro<sup>70</sup>突变为 Leu<sup>18</sup>。在 48 高温时,突变的 PenI 无活性。热诱导时,基因表达不受抑制的青霉素酶,其活性是野生型酶的 98 倍。主要是 Leu<sup>70</sup>的侧链破坏了 PenI 的折叠状态,导致热稳定性大幅下降,使青霉素酶充分表达。因此高温下,阻遏蛋白  $\alpha$ -转折处的 Pro 是维持其结构稳定的关键因素。

## 4 结束语

分子设计已在酶的改性、免疫球蛋白及药物受体研究等方面取得了一系列的成功。但由于复杂的蛋白质结构与功能关系至今尚未找到类似于 DNA 与氨基酸序列对应关系的密码子,因此分子设计仍是蛋白质工程的薄弱点。鉴于 Pro 对蛋白质热稳定

性的特殊贡献,因此若要提高酶的热稳定性,不妨在主链构象不发生急骤变化的情况下,在  $\alpha$ -转折或无规卷曲中引入 Pro 的理论(the proline theory)无疑是提高蛋白质热稳定性分子设计的重要途径<sup>[19]</sup>。由于蛋白质的热稳定性受诸多因素的影响,因此并非 Pro 置换都会改善热稳定性<sup>[20]</sup>。但随着对一级结构与生物功能相关性的掌握和对蛋白质三维结构的测定,分子设计的准确性也会越来越高,Pro 理论将得到进一步的充实和验证。

## 参考文献

- [1] Vieille C., Zeikus J. G. Trends Biotechnol, 1996, 14:183 - 190
- [2] Levitt M. Biochemistry, 1978, 17: 4277 - 4285
- [3] Watanabe K., Masuda T., Ohashi H., et al. Eur J Biochem, 1994, 226: 227 - 283
- [4] Suzuki Y., Oishi K., Nakano H., et al. Appl Microbiol Biotechnol, 1987, 26: 546 - 551
- [5] Watanabe K., Chishiro K., Kitamura K., et al. J Biol Chem, 1991, 266: 24287 - 24294
- [6] Dekker K., Yamagata H., Sakaguchi K., et al. J Bacteriol, 1991, 173:3078 - 3083
- [7] Yutani K., Hayashi S., Sugisaki Y., et al. Proteins Struct Funct Genet, 1991, 9:90 - 98
- [8] Tagaya M., Yagami T., Noumi T., et al. J Biol Chem, 1989, 264:990 - 994
- [9] Takagi M., Imanaka T. FEBS Lett, 1989, 254:43 - 46
- [10] Medvedkin V. N., Permyakov E. A., Klimenko L. V., et al. Pro Engng, 1995, 8:63 - 70
- [11] Warren G.L., Petsko G.A. Pro Engng, 1995, 8:905 - 913
- [12] Matthews B.W. Annu Rev Biochem, 1993, 62:139 - 160
- [13] Matthews B.W., Nicholson H., Becktel W.J., et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 6663 - 6667
- [14] Masui A., Fugiwara N., Imanaka T. Appl Environ Microbiol, 1994, 50: 3579 - 3584
- [15] Nakamura S., Tanaka T., Yada R.Y., et al. Pro Engng, 1997, 10:1263 - 1269
- [16] 朱国萍,滕脉坤,伍传金等. 生物化学与生物物理学报, 1998, 30:607 - 610
- [17] Zhu G.P., Xu C., Teng M.K., et al. Pro Engng, 1999, (in press)
- [18] Imanaka T., Nakae M., Ohta T., et al. J Bacteriol, 1992, 174:1423 - 1425
- [19] Suzuki Y., Hatagaki K., Oda H., et al. Appl Microbiol Biotechnol, 1991, 34:707 - 714
- [20] Tougard P., Le T.H., Minard P., et al. Pro Engng, 1996, 9:181 - 187

## Contribution of Prolines to Protein Thermostability

Zhu Guoping<sup>1,3</sup> Teng Maikun<sup>1,2</sup> Wang Yuzhen<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Molecular Biology and Cell Biology, and <sup>2</sup>the Key Lab of Structure Biology of USTC, CAS, School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

**Abstract** Thermostability of enzymes can be altered by single amino acid substitution. Prolines play very specific roles in protein secondary structure and heat stability. They prefer  $\alpha$ -turns and random coils, but are rarely found in  $\alpha$ -helices and  $\beta$ -sheets. Improvement in thermostability of enzymes by protein engineering may introduce Pro at suitable  $\alpha$ -turns and random coils. The rigid pyrrolidine ring can make the conformation of surroundings to be more reasonable by reducing the backbone unfolding entropy of proteins. This new prolines theory will be improved and become perfect.

**Key words** Proline, Secondary structure, Thermostability, Protein engineering

(接第 54 页)

- [10] Zhang X. Medaniel GR. Giambrone JJ. ,Poult Sci ,1995 ,74 : 1253 - 1258
- [11] Wei R. Dentine MR. Bitgood JJ. ,Anim Genet ,1997 ,28 (4) : 291 - 294
- [12] Kantanen J. Vilkki J. Elo K. et al ,Anim Genet ,1995 ,26 (5) : 315 - 320
- [13] Gwakisa PS. Kemp SJ. Teale AJ. ,Anim Genet ,1994 ,25(2) :89 - 94
- [14] Mel'nikova MN. Grechko VV. Mednikov BM. ,1995 ,31 (8) : 1120 - 1231
- [15] Ezer AD. Williams RW. Goldwitz D. J. Hered ,1996 ,87 :450 - 455
- [16] Glazko VI. Domanskii NN. Sozinov AA. ,Tsitol Genet ,1998 ,32 (5) :80 - 93
- [17] Martin G.B. et al ,Proc. Natl. Acad. Sci. USA ,1991 ,88 :2336 - 2340
- [18] Michelmore R. W. et al ,Proc. Natl. Acad. Sci. USA ,1992 ,94 : 896 - 901
- [19] Levin I. Santangelo L. Cheng HH. et al J. Hered ,1994 ,85 :79 - 85
- [20] Levin I. Crittenden LB. Dodgson JB. , Genomics ,1993 ,16 (1) : 224 - 230
- [21] Cheng HH. Levin I. Vallejo RL. et al ,Poult Sci ,1995 ,74 (11) : 1855 - 1874
- [22] Cushwa WT. Dodds KG. Crawford AM. et al ,Mamm Genome , 1996 ,7(8) :580 - 585
- [23] Horvat S. Medrano JF. ,Proceedings of fifth world congress on genetics applied to livestock production ,1994 ,21 :41
- [24] Wei R. ,Proceeding of fifth world congress on genetics applied to livestock production ,1994 ,21 :71
- [25] 谢新民,施启顺,柳小春等, 湖南农业大学学报,1998 ,24 (2) :143 - 147

## RAPD Analysis Technique and It's Application to The Studies on The Animal Genetics and Breeding

Zhang Piyan Xie Zhuang Liu Honglin Chen Jie

(College of Animal Science and Technology ,Nanjing Agricultural University ,Nanjing 210095)

**Abstract** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) ,a polymerase chain reaction based technique testing DNA polymorphisms ,has been widely used in genome research. In the field of animal genetics and breeding , RAPD technique provides a powerful tool for detection of gene diversity of populations and analysis of genetic relationship. It also can be used for analysis of linkage between RAPD markers and quantitative trait loci (QTL) and Markers Assisted Selection (MAS) . Theory and features of RAPD were also discussed in this paper. According to the authors ,RAPD technique has good perspective.

**Key words** RAPD ; Gene Diversity ; Genetic Relationship ; Linkage Analysis ; MAS