

蝮蛇毒素 R3 晶型 0.28 nm 分辨率结构

唐 亮^a 周元聪^b 林政炯^{a*}

(^a 中国科学院生物物理研究所生物大分子国家实验室 北京 100101)

(^b 中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

摘要 蝮蛇毒素 (agkistrodotoxin) 是从江浙蝮蛇毒液中提取的一种磷脂酶 A2 型的突触前神经毒素。在碱性的条件下培养出了该毒素新晶型 (R3) 晶体。用 X 射线晶体学分子置换方法测定了该晶体 0.28 nm 分辨率结构。经初步修正后模型晶体学 *R* 因子降到 0.23, 立体化学合理。对蝮蛇毒素 R3 晶型与其它晶型进行了结构比较。结果表明, 蝮蛇毒素分子界面识别部位的一个独特疏水区在各种晶型晶体堆积中均起主要作用, 对该疏水区可能的生物学功能进行了讨论。

关键词 蝮蛇毒素, 神经毒素, 磷脂酶 A2, X 射线衍射, 晶体结构, 疏水作用

Structure of Agkistrodotoxin in R3 Crystal Form at 0.28 nm Resolution

TANG Liang^a ZHOU Yuan - Cong^b LIN Zheng - Jiong^{a*}

(^a National Laboratory of Biological Macromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101)

(^b Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai, 200031)

Abstract Agkistrodotoxin is a phospholipase A2 - type presynaptic neurotoxin from *Agkistrodon halys pallas*. The neurotoxin crystallizes in a new crystal form, R3, under basic conditions. The crystal structure has been determined at 0.28 nm resolution by the molecular replacement technique and refined to a crystallographic *R* factor of 0.23 and reasonable stereochemistry. The crystal structure of agkistrodotoxin in R3 form is compared with those of the other two crystal forms. The extensive intermolecular hydrophobic interactions occurring at the interfacial recognition site of each molecule play an important role in the crystalpacking for all the three crystal forms. The possible biological implications of the hydrophobic interactions are discussed.

Keywords agkistrodotoxin, neurotoxin, phospholipase A2, X - ray diffraction, crystal structure, hydrophobic interaction

蝮蛇毒素 (agkistrodotoxin) 是一种强烈的突触前神经毒素, 是江浙蝮蛇 (*Agkistrodon halys pallas*, 即 *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*) 毒液的主要毒性成分, 对小鼠的最小致死剂量为 0.055 $\mu\text{g}/\text{g}$ ^[1-3]。蝮蛇毒素是典型的第二类磷脂酶 A2 (EC 3.1.1.4), 能够

催化 3 - Sn - 磷脂 2 - C 位酯键的水解反应, 生成游离的脂肪酸和溶血磷脂, 并且这种催化对于聚集态的底物具有强烈的偏好^[4]。该毒素含有 122 个氨基酸残基, 分子内存在七对二硫键, 分子量约 13400 Daltons, 等电点为 6.9, 与绝大多数磷脂酶 A2 型突触

* E - mail: lin@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2000 - 07 - 04, 修回日期: 2000 - 09 - 25, 定稿日期: 2000 - 11 - 03, 中国科学院重大项目 (KJ951 - A1 - 601) 资助

(Received July 4, 2000. Revised September 25, 2000. Accepted November 3, 2000)

前神经毒素的强碱性等电点很不相同. 本文报道用 X 射线晶体学方法测定蝮蛇毒素新晶型 (R3) 0.28 nm 分辨率结构.

1 方法

1.1 蛋白质结晶和数据收集

使用悬滴汽相扩散法进行晶体生长. 悬滴为 6 μL 10 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ 蛋白质, 2 μL 0.6 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KCl, 1 μL 30 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ CaCl_2 及 2 μL 35% 二氧六环的混合物, 缓冲液为 pH 8.5 的 0.1 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ Tris-HCl, 平衡液为 0.3 mL 60% MPD. 置于 18 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中, 两周内晶体长大至 0.8 $\text{mm}\times 0.2\text{mm}\times 0.2\text{mm}$. 在日本筑波光子工厂同步辐射光源 BL6A2 上用魏森堡法

收集晶体衍射数据^[5]. X 射线波长为 0.1000 nm, 使用半径 430 mm 的魏森堡相机, 晶体到探测器距离为 430 mm, 相板 (imaging plate) 大小为 200 $\text{mm}\times 400\text{mm}$. 每张画面回摆角为 14 $^{\circ}$, 相板同步移动 7 mm, 即耦合常数为 2 $^{\circ}/\text{mm}$, 回摆四次, 速度为 0.5 $^{\circ}/\text{s}$, 相邻画面交叠 0.5 $^{\circ}$, 共收集 14 张画面.

数据处理使用 DENZO 和 SCALEPACK 程序^[6]. 数据处理显示晶体属于 R3 空间群, 晶胞参数 $a = b = 12.520\text{ nm}$, $c = 4.969\text{ nm}$. 数据分辨率为 0.28 nm, $R_{\text{merge}} = 8.1\%$, 共收集 35425 个衍射, 其中独立衍射点数为 5965, 数据完整度 83.4%, 最外分辨率壳层 0.29~0.28 nm 完整度 65.8%. 不对称单位含有两个分子, 对应的 V_m 值为 0.0027 $\text{nm}^3/\text{Dalton}$, 晶胞内溶剂含量估算为 54.0%^[7].

表 1 分子置换

Table 1 Molecular replacement

自身旋转函数, 分辨率 0.3~1 nm, 积分半径 1.8 nm								
No.	α	β	γ	κ	峰高			
1	0.00	180.00	63.93	180.00	34.5(22.0)			
2	0.00	180.00	5.56	180.00	34.0			
交叉旋转函数, 分辨率 1.2~0.3 nm, 积分半径 1.8 nm								
分子	No.	α	β	γ	CC			
A	1	64.59	11.96	308.14	27.6(15.6)			
B	2	11.20	170.14	210.82	21.2(15.6)			
平移函数, 分辨率 1~0.3 nm								
分子	x	y	z	CC	R			
A	0.87121	0.18561	0.00000	49.6(37.9)	44.8(49.2)			
B	0.30303	0.17424	0.00000	36.0(33.2)	49.9(50.6)			
固定	搜索	x	y	z	CC	R		
A	B	0.30267	0.17137	0.47788	62.0(39.7)	39.9(48.0)		
A	B	0.63600	0.83803	0.14455	62.0	39.9		
A	B	0.96933	0.50470	0.81121	62.0	39.9		
刚体修正, 分辨率 1.5~0.3 nm								
	α	β	γ	x	y	z	CC	R
A	56.48	11.31	316.09	0.87311	0.18870	0.00043	68.6	36.8
B	22.34	168.62	223.35	0.30262	0.17245	0.47505	68.6	36.8

CC: 相关系数; α, β, γ : 尤拉角; x, y, z : 分数笛卡尔坐标. 括号中的数值表示最高的背景峰.

1.2 分子置换

使用分子置换法^[8]测定结构, 相关程序为 AMoRe^[9]. 数据分辨率范围为 1~0.3 nm, 积分半径为 1.8 nm 的自身旋转函数显示高度为 34.5 和 34.0 的两个峰(根据 R3 空间群自身旋转函数的对称性, 这两个峰互为等价), 提示可能存在一个非晶体学二

重轴(表 1). 交叉旋转函数的初始模型采用蝮蛇毒素 $P2_12_12_1$ 结构^[10]中的 A 分子. 模型晶胞为 7 nm \times 6 nm \times 5 nm 的正交 $P1$, 积分半径 1.8 nm, 分辨率 1.2~0.3 nm, 得到两个突出的交叉峰(表 1). 对它们计算 1~0.3 nm 的平移函数, 得到了明显的平移解(表 1). 对这两个解用 1.5~0.3 nm 数据作刚体修正, 晶

体学 R 因子为 36.8%, 相关系数为 68.6% (表 1).

1.3 初步结构修正

结构修正采用 XPLOR 程序^[11], 并应用 Engh 和 Huber 的立体化学参数^[12]. 模型重建和调整使用 O 程序^[13]. 在修正中, 以单体为单位使用了非晶体学对称性制约, 主链原子的位置权重和 B 因子 σ 分别为 0.836 kJ/mol·nm² 和 0.02 nm².

对两个分子置换解首先进行一轮刚体修正, 每个分子作为一个刚体单位, 数据分辨率 1.50 ~ 0.28 nm, $F > 2\sigma$. 然后使用 0.80 ~ 0.28 nm, $F > 2\sigma$ 数据, 经一轮位置修正、限制性独立 B 因子修正和一轮 4000 K 模拟退火, R 因子降到 0.23, R_{free} 因子降到 0.35. 目前的初步修正模型含有两个分子共 1923 个非氢蛋白质原子和 1 个分子间钙离子. 键长、键角对理想值的均方根偏差分别为 0.0009 nm 和 1.33°.

2 结果与讨论

蝮蛇毒素 R3 晶型分子结构与其它两种已被测定晶型(正交与单斜^[10, 14])的分子结构极其相似, 也具有第二类磷脂酶 A2 结构的基本特征, 即分子主要由三段长螺旋, 一段双链 β 折叠层 (β -wing), 一个结合钙离子环区和一个覆盖在分子表面上的 C 端肽段等结构片段组成. 分子有一个疏水通道, 底物分子经由疏水通道接近位于分子内部的酶活性中心 His48 和 Asp99. 分子还有一个位于疏水通道出口处的界面识别部位, 以便识别聚集态底物分子. R3 晶型结构也具有正交与单斜晶型结构所展示的独特的蝮蛇毒素神经毒性部位(55 ~ 61 与 85 ~ 91 肽段)构象^[14]. R3 晶型和正交晶型分子 α -C 原子均方根偏差值为 0.0486 nm, R3 晶型和单斜晶型的相应值为 0.0803 nm(采用 CCP4 库^[15]中 lsqkab 程序, 选择分子 A 进行计算). 可见, R3 晶型分子更象正交晶型分子. 这显然与这两种晶型结晶条件类似^[10, 本文]有关. 与单斜晶型的差别主要位于 β -wing 的尖端. 看来 β -wing 构象易变, 至少易受 pH 值影响(R3 晶型 pH = 8.5, 单斜晶型 pH = 4.5). 由于 β -wing 靠近神经毒性部位, 这种构象易变性可能与神经毒性有关.

蝮蛇毒素的三方、正交与单斜晶型不对称单位均含有多个分子, 因而这些结构分析为研究蝮蛇毒素晶体堆积相互作用提供了丰富的数据. 单斜晶型不对称单位中 8 个分子形成两个四体^[14], 正交晶型不对称单位中 6 个分子形成三个钙离子相关的二体^[10], 三方晶型不对称单位两个分子 A 和 B 也形成

类似的钙离子相关的二体(图 1), 即通过一个钙离子与 A, B 的 Asp71, Glu92 的侧链 O 原子及 Ile72 主链 O 原子的络合将 A, B 两分子联系在一起. 这种钙离子相关的二体主要通过一独特的疏水区的疏水相互作用堆积成晶体(图 2, 3). 此独特疏水区与界面识别部位重叠, 主要包括 Ile19, Pro20, Phe24, Trp31, Met118 和 Phe119 等残基, 它们在结构上连成一片(图 3). 由 GRASP 程序算得, 分子 A 和 B 的水可及表面积分别为 68.79 nm² 和 68.99 nm², 而疏水相互作用联系分子对总水可及表面积为 131.28 nm², 因此由于疏水相互作用而被埋藏的水可及表面积达 6.5 nm², 接近 10% 的分子总水可及表面积. 可见该疏水区的疏水相互作用是相当强的. 有趣的是, 无论单斜晶型四体之间还是正交晶型钙离子相关二体之间也存在类似疏水区的疏水相互作用. 而且它们相应的被埋藏的水可及表面积也与三方晶型相当(单斜晶型 7%, 正交晶型 7.5% ~ 13.5%, 参考文献 [10, 14]), 表明此种疏水相互作用在晶体堆积中的极端重要性. 由于疏水相互作用的非特异性, 在蝮蛇毒素同一晶型或不同晶型晶体中, 疏水作用联系的两个分子的相对取向, 相对位置表现出多样性. 疏水相互作用的非特异性与经过各种努力始终不能培养出蝮蛇毒素高度有序性晶体的实验事实一致. 例如 R3 晶型晶体可以长得很大(0.8 mm × 0.2 mm × 0.2 mm), 但即使用同步辐射光源, 衍射能力也只能达到 0.28 nm.

蝮蛇毒素的上述疏水相互作用是很独特的, 不同于其它磷脂酶 A2, 因此在性质与功能方面可能有某种含义. 界面识别部位疏水区具有较为强烈的疏水效应, 使得蝮蛇毒素分子强烈倾向于沿这一部位发生聚合从而使之与极性溶剂分离. 这解释了蝮蛇毒素在溶液中易于聚合的倾向^[16]. 蝮蛇毒素的作用部位是突触前膜. 当蝮蛇毒素发生生物学作用时涉及磷脂酶 A2 对突触前膜磷脂的水解作用. 上述疏水相互作用可能提示一种自我保护机制: 在溶液中蝮蛇毒素分子可能两两结合成疏水作用相关的分子对, 这样屏蔽了界面识别部位与疏水通道出口, 从而避免毒素分子在到达突触前膜之前因与非突触前膜磷脂作用而消耗掉. 另外, 蝮蛇毒素的疏水相互作用特点还可能提示该神经毒素与脂膜的相互作用模式: 可以设想, “分子对”中每个分子的界面识别部位都为对方提供了一个类似于脂膜的表面, 因而蝮蛇毒素结构中观察到的疏水相互作用可能模拟了发生在磷脂酶 A2 与脂膜的界面上的情况.

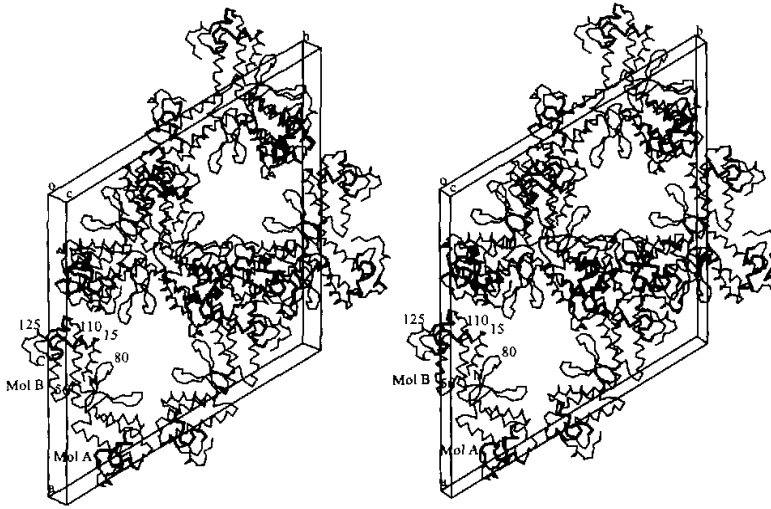


图 1 蝮蛇毒素 R3 晶型晶胞分子堆积(沿 *c* 方向观察),显示钙离子相关的二体(Mol A + Mol B)
Fig.1 Crystal packing of agkistrodotoxin in R3 crystal form(viewed down the crystallographic *c* axis),
 showing the Ca^{2+} ion - related dimer(Mol A + Mol B)
 折线表示分子多肽链主链 α 碳原子走向

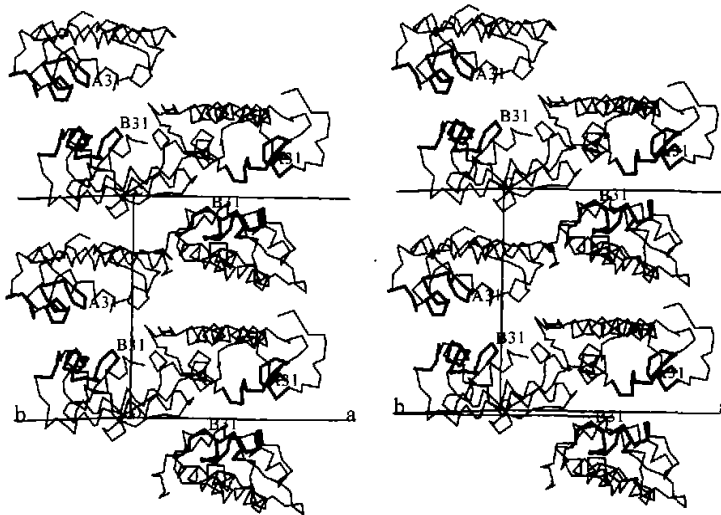


图 2 蝮蛇毒素 R3 晶型晶胞分子堆积(沿与 *c* 垂直方向观察),显示分布广泛的涉及界面识别部位疏水区的疏水相互作用
Fig.2 Crystal packing of agkistrodotoxin in R3 crystal form (viewed in a direction perpendicular to the crystallographic *c* axis),
 showing the extensive hydrophobic interactions concerning a hydrophobic region at interfacial recognition site
 粗折线表示疏水区

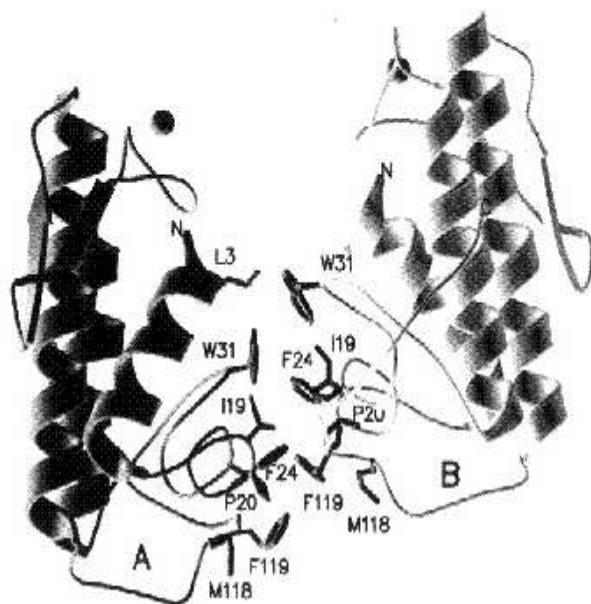


图3 界面识别部位疏水区疏水相互作用图

Fig. 3 A diagram, showing the hydrophobic interactions of the hydrophobic region at interfacial recognition site

致谢 蝮蛇毒素 R3 晶体的数据收集与处理得到了日本高能物理研究所国家实验室 Noriyoshi Sakabe 教授和 Nobuhisa Watanabe 博士的大力支持与帮助。

References

- Chen, Y. - C.; Wu, X. - F.; Zhang, J. - K.; Jung, M. - S.; Hsu, K. *Acta Biochemica et Biophysica Sinica*, **1981**, *13*, 205.
- Chen, Y. - C.; Maraganore, J. M.; Reardon, I.; Henrikson, R. L. *Toxicon*, **1987**, *25*, 401.
- Konki, K.; Zhang, J. - K.; Xu, K.; Kuganyamru, H. *J. Biochem.*, **1989**, *105*, 196.
- Dennis, F. A. *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 13057.
- Sakabe, N. *J. Appl. Crystallogr.*, **1983**, *16*, 542.
- Orwinowski, Z.; Minor, W. In *The HKL Program Suite*, in preparation.
- Matthews, B. W. *J. Mol. Biol.*, **1968**, *33*, 491.
- Rossmann, M. G.; Blow, D. M. *Acta Crystallogr.*, **1962**, *15*, 24.
- Navaza, J. *Acta Crystallogr.*, **1994**, *A50*, 157.
- Tang, L.; Zhou, Y. - C.; Lin, Z. - J. *Acta Crystallogr.*, **1999**, *D55*, 1986.
- Brünger, A. T. *XPLOR manual, Version 3.1*, Yale University, New Haven, CT, **1992**.
- Engl, R. A.; Huber, R. *Acta Crystallogr.*, **1991**, *A47*, 392.
- Jones, T. A.; Zou, J. - Y.; Cowan, S. W. *Acta Crystallogr.*, **1991**, *A47*, 110.
- Tang, L.; Zhou, Y. - C.; Lin, Z. - J. *J. Mol. Biol.*, **1998**, *282*, 1.
- Collaborative Computational Project, Number 4. *Acta Crystallogr.*, **1994**, *D50*, 760.
- Ren, H.; Ji, Y. - H. *Prog. Biochem. Biophys.*, **1997**, *24*, 522.

(Ed. CHENG Biao)