

血红素氧合酶 HugZ 组氨酸-249 对组氨酸-245 侧链缺失补偿的结构基础*

沈溪辉^{1, 2)} 胡永林¹⁾ 王大成^{1)**}

(¹⁾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; ²⁾中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 血红素氧合酶 HugZ 是幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)利用宿主血红素作为铁源的关键蛋白。HugZ 的 His245 残基侧链咪唑基与血红素中心铁配位结合, 是酶活中心的重要组成部分。用定点突变的方法构建 HugZ 突变体 H245A、H249A 和 H245A/H249A 基因, 并将突变体蛋白表达纯化。通过 X 射线晶体学途径解析了突变体 H245A 与血红素复合物的 2.55Å 分辨率晶体结构。结构解析表明, HugZ 的 His249 残基侧链咪唑基团与血红素的铁原子结合, 从而补偿了 His245 侧链缺失。这种结构特征在已知血红素氧合酶中未曾发现。Val238 ψ 平面的可翻转和 Gly239 的柔性是 His249 能与血红素配位结合的关键原因, 二者的共同作用改变了 C 端肽链的走向, 使 Val238 与 His249 之间的柔性回折与 $\alpha 1$ 螺旋的相互作用发生解离, 并向远离血红素的方向伸展。HugZ 蛋白与血红素结合的光谱实验证明 HugZ 柔性 C 端上的组氨酸残基有利于 HugZ 与血红素的结合。研究表明, 含多个组氨酸残基柔性 C 端的存在有利于血红素氧合酶 HugZ 结合和分解血红素。

关键词 幽门螺旋杆菌, 血红素氧合酶, 致病菌, 铁元素摄取, 补偿作用

学科分类号 Q5

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00513

血红素氧合酶最早发现于哺乳动物中, 它们催化血红素氧化降解, 并生成胆绿素(biliverdin) IX、二价铁和一氧化碳^[1]。其中, 最具有代表性的是来自于人类的血红素氧合酶 HO-1。HO-1 是一类全 α 螺旋单体结构的蛋白质, 通过近端(proximal)和远端(distal)两个 α 螺旋组成的结合口袋与血红素作用。其中, 较为刚性的近端 α 螺旋上的组氨酸残基(His25)侧链与血红素中心的铁原子配位结合, 它同远端的催化口袋一起构成 HO-1 的酶活中心^[2]。HO-1 的 His25 突变体以及与其同源的白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)血红素氧合酶 HmuO 的 His20 突变体催化降解血红素的光谱实验显示, 组氨酸侧链的缺失会引起血红素氧合酶活性的丧失, 但可以通过加入外源的咪唑来恢复这类突变体的活性^[3-4]。因此, HO-1 的 His25 残基被认为是这一类血红素氧合酶的催化关键残基。

幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)为革兰氏微需氧菌, 是许多胃肠道疾病的主要病原体^[5]。幽门

螺旋杆菌的血红素氧合酶 HugZ 是一类新发现的细菌源血红素氧合酶, 限制性培养实验证明 HugZ 为幽门螺旋杆菌利用血红素作为唯一铁源所必需^[6]。HugZ 在结构上属于 FMN 结合蛋白相关的 split-barrel 超家族, 与已知结构的 HO-1 类型的血红素氧合酶或其他细菌源的血红素氧合酶不具有相似性。对 HugZ 与血红素复合物的晶体学研究结果表明, 这个蛋白质同样是通过一个组氨酸残基 His245 与血红素的铁原子配位结合, 但酶活鉴定呈现, H245A 突变体具有血红素氧合酶活性^[7]。该实验结果表明, HugZ 245 位的组氨酸残基并非其

* 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2011CB910304, 2011CB911103), 中国科学院知识创新工程资助项目(KSCX2-EW-J-3)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-64888547, E-mail: dcwang@ibp.ac.cn

收稿日期: 2011-11-07, 接受日期: 2011-12-05

酶活所必需, 这与 His20 残基在 HO-1 型血红素氧合酶活性机制中所起的重要作用形成强烈对比. 进一步研究和搞清 His245 残基在 HugZ 结合血红素以及催化血红素分解中的作用, 对深入了解 HugZ 的酶活机制有重要的意义.

本文通过蛋白质晶体学方法解析 HugZ 突变体 H245A 与血红素的复合物晶体结构, 发现了 His249 补偿 His245 侧链缺失的现象, 并以光谱学的方法证明组氨酸残基侧链的存在有利于血红素与 HugZ 的结合.

1 材料与方法

1.1 HugZ 突变体的构建

HugZ 原始基因由第三军医大学邹全明实验室^[6]提供. 在原有 pET22b-HugZ-noHistag 质粒上, 使用互补引物通过 QuikChange[®]的方法扩增获得单点突变体 H245A、H249A 和双位点突变体 H245A/H249A(表 1), 所获得含突变体序列的质粒经测序鉴定后用于蛋白质表达. 突变体质粒所表达的蛋白质不带有任何纯化标签, 与野生型蛋白相比只在特定突变残基侧链上存在区别.

Table 1 Primers used to construct the mutant plasmids

Mutant plasmid	Primer	Primer sequence
pET22b-H245A-notag	H245A-F	GGGATAAAGGCAACCCGGCGAATTTTCGCTCACAAGAAAT
	H245A-R	ATTTCTGTGAGCGAAATTCGCCGGTTGCCCTTATCCC
pET22b-H249A-notag	H249A-F	CAACCCGCACAATTTTCGCTGCGAAGAAATAAC
	H249A-R	GTTATTTCTTCGCAGCGAAATTGTGCGGGTTG
pET22b-H245A/H249A-notag	H245A/H249A-F	CAACCCGGCGAATTTTCGCTGCGAAGAAATAAC
	H245A/H249A-R	GTTATTTCTTCGCAGCGAAATTCGCCGGGGTTG

1.2 蛋白质纯化与结晶搜索

上述构建的 HugZ 突变体表达于大肠杆菌 (*Escherichia coli*)BL21(DE3)菌株中. 295 K 温度诱导表达的裂菌上清液使用 NTA-Ni 柱(Novagen 公司)纯化(HugZ 的蛋白表面有内源性的组氨酸残基, 可与 NTA-Ni 柱特异结合), 并以 100 mmol/L 咪唑洗脱获得粗提蛋白. 粗提样品经 Hitrap-Desalting 柱(GE Healthcare 公司)脱盐和 Hitrap-Q 阴离子交换柱(GE Healthcare 公司)进一步纯化后用于解离常数测定. 用于晶体生长的 H245A 突变体样品则是由上述经离子交换柱纯化样品与血红素按 1:2 比例混合, 并加入 10 mmol/L 的叠氮化钠作为反应抑制剂所获得的 H245A- 血红素复合物样品. 该样品再经 Superdex200 16/60 柱(GE Healthcare 公司)纯化和去除残余未结合的血红素后, 用于晶体搜索.

用 20 g/L H245A- 血红素复合物样品通过座滴法在 0.1 mol/L pH 6.5 Bis-Tris 缓冲液, 20% PEGMME 5000 为沉淀剂, 10%丙酮为添加剂, 于 289 K 条件下生长 3 天, 获得衍射用的片状晶体.

1.3 数据收集与结构解析

晶体的表征和衍射数据收集在中国科学院生物物理研究所 FR-E VariMax X 射线衍射数据收集系统(Rigaku 公司)上进行. 复合物晶体样品经石蜡油(paraffin 公司)防冻保护, 于 93 K 温度环境下, 采集 180 幅画面, 以此保证数据完整性.

衍射数据经 Imosflm^[9]和 CCP4^[10]软件包处理, 以 HugZ 野生型结构(PDB ID 3GAS)为分子置换模型通过 CCP4 中的 Phaser^[11]获得初始相位. 初始模型用 Phenix^[12]软件包中的 refine 程序修正, 并在 Coot 晶体学作图软件中按残余电子密度手动进行残基突变和引入血红素分子模型, 进一步在 Phenix 与 Coot 中反复迭代修正后最终获得结构模型.

1.4 解离常数测定

按 1.2 中方法 Hitrap-Q 纯化后的突变体 H245A、H249A、H245A/H249A 的未结合血红素蛋白样品, 在总体积为 1 ml 的体系中分别以 3 μ mol/L 的浓度与 0、0.5、1、2、4、6、8、10、12、14、16、20、22、24、28、30 μ mol/L 的血红素混合, 于 298 K 孵育 2 h 后测定 410 nm 处的吸光度值

(Hitachi U-2010). 未加入蛋白质的对应浓度血红素样品作为对照. 所获得的数据扣除对照值, 用 GraphPad Prism 5(GraphPad Software Inc.)软件中的 One site(Total and nonspecific binding)结合曲线进行曲线拟合计算解离常数 K_d .

2 结果与讨论

2.1 His249 与血红素铁的配位结合

H245A- 血红素复合物晶体属于 C2 空间群, 分辨率为 2.55Å(表 2). 模型最终修正的 R 与 R_{free} 因子分别为 20%与 25%. H245A 晶体不对称单位中有 6 个 H245A 单体分子, 与野生型 HugZ 的结构一样, H245A 蛋白分子仍然以 split-barrel 方式折叠并构成二体功能单位, 二者结构除了柔性末端外

基本相同(RMSD=0.486Å), 血红素分子在晶体结构中也位于相同位置, His245 侧链的缺失没有引起 HugZ 结构的显著变化(图 1a).

对比二者的柔性 C 端, H245A C 端肽链走向变化始于 Val238. 在野生型中处于游离状态的 His249 以与野生型 His245 基本相同的方式在 H245A 中和血红素铁配位结合, His249 与 Val238 之间的柔性区域在增加了 4 个氨基酸残基后以更为扭曲的方式向下方伸展. 这是由于 Val238 的 ψ 肽键平面相对于野生型发生了 121°翻转和 Gly239 的柔性使 H245A 改变了肽链原来朝向 $\alpha 1$ 螺旋的走向. $\alpha 1$ 螺旋上的 Gln26 是野生型蛋白固定柔性末端的重要残基. H245A 肽链走向的变化使柔性 C 端与 $\alpha 1$ 螺旋不再作用, Gln26 侧链也发生了 151°的偏转(图 1b~d).

在各种血红素相关蛋白中, 与血红素铁配位的残基都起着非常重要的作用. 幽门螺旋杆菌的血红素氧合酶 HugZ 与 HO-1 类型的血红素氧合酶虽然在结构上不同源, 但它保留了以组氨酸残基侧链与血红素铁配位结合的方式. H245A 突变体结构中 His249 补偿 His245 的侧链缺失现象在所有血红素氧合酶的结构中是首次发现. HugZ 能够进行这种替换作用的原因是它与血红素的配位残基位于较为柔性的 C 端上, 且有两个可供配位的组氨酸残基, 而 HO-1 类型的血红素氧合酶与血红素铁配位的组氨酸残基都位于较为刚性的 α 螺旋上且只有一个组氨酸残基^[1]. 这一结果进一步说明了 HugZ 的 C 端不规则卷曲是柔性的^[7], 而且证明了组氨酸残基对 HugZ 血红素氧合酶活性的重要性. 与 HugZ 序列同源性最高的空肠弯曲菌血红素氧合酶 Cj1613c^[14]末端同样含有多个组氨酸残基(图 2), 说明这类 split-barrel 结构血红素氧合酶倾向于使用这种含有多个组氨酸残基的柔性 C 端结构保持降解血红素的活性, 使致病菌获得足够铁离子, 用以生长和繁殖.

2.2 组氨酸残基对 HugZ 血红素结合能力的作用

生理条件下的血红素氧合酶催化降解反应, 起始于结合的三价高铁血红素被胞内的还原体系还原为二价铁血红素. 在体外反应体系中, 与 HugZ 结合的高铁血红素不会被 HugZ 催化降解^[15]. 血红素与 HugZ 蛋白结合后在 410 nm 左右生成特征 Soret 峰^[6]. 利用这两种特性, 我们用无还原剂条件下固定浓度 HugZ 与不同浓度血红素结合后, 于 410 nm 的吸光度值表征该条件下生成的 HugZ- 血

Table 2 Crystallographic data of H245A-heme complex

H245A	
A. Data collection	
Space group	C2
X-ray source	Rigaku RF-E/Raxis IV++, IBP
Wavelength/Å	1.5418
Unit cell parameters	$a=150.620\text{Å}$ $b=86.940\text{Å}$ $c=131.660\text{Å}$ $\alpha=\gamma=90^\circ$ $\beta=110.94^\circ$
Resolution range/Å	70.34~2.55
Last shell/Å	2.69~2.55
Observed reflections	181778(18111)
Unique reflections	50053(6087)
Redundancy	3.6(3.0)
Completeness/%	99.6(81.5)
Mean $I/\sigma(I)$	10.0(2.3)
Rsym/% ¹⁾	10.8(45.3)
Matthews/(Å ³ ·Da ⁻¹)	2.4
Solvent content/%	48.7
Asymmetric Unit Content	6 molecules
Wilson B/Å ²	27.66
B. Structure refinement	
Resolution range/Å	35.49~2.55
R	0.203
R_{free} ²⁾	0.254
Ramachandran statistics/% ³⁾	
Most favored regions	93.1
Additionally allowed regions	6.3
Generously allowed regions	0.1
Disallowed regions	0.4

¹⁾Rsym= $\sum_{hkl} \sum_i (|I_i(hkl)| - \langle I(hkl) \rangle) / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$. ²⁾ R_{free} calculated using 10% of total reflections omitted from refinement. ³⁾Ramachandran statistics calculated using PROCHECK^[13].

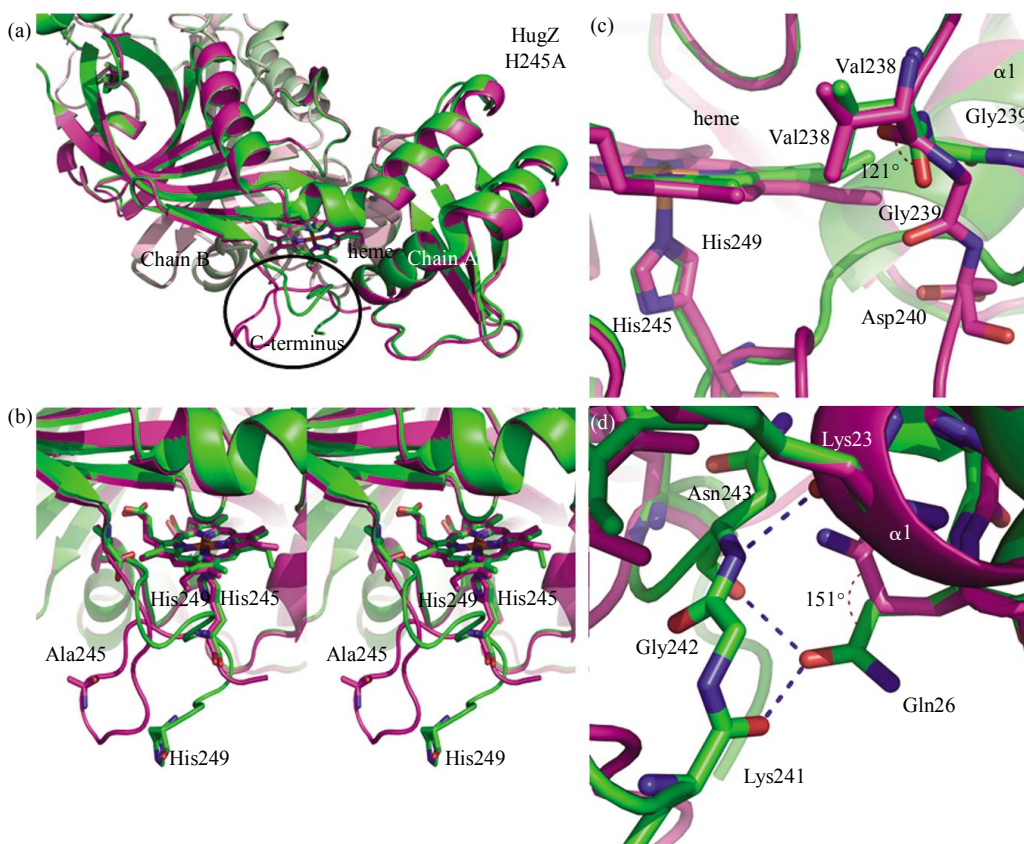


Fig. 1 Structural comparisons between HugZ and its H245A mutant

The mutant H245A dimer structure (pink) was superposed onto that of the wild-type HugZ (3GAS, green). (a) Functional homodimer of HugZ containing two heme binding pockets, each constructed by two monomers, and no significant difference observed between the two structures except the flexible C-termini. (b) C-terminal loop region of the mutant H245A adopts a different folding to that of the wild-type protein HugZ between residues Gly239 and Lys251. (c) Imidazole group of His249 in the H245A mutant coordinates the heme iron, adopting a similar conformation to that of the His245 from the wild-type HugZ. (d) Hydrogen-bond interactions are formed between Lys23 and Gln26 with the C-terminal loop residues Lys241, Gly242, and Asn243 in the structure of wild-type HugZ, whereas in the H245A mutant, no interactions were observed between the $\alpha 1$ helix and the loop region, and, consequently, the sidechain of Gln26 adopts a different rotamer.

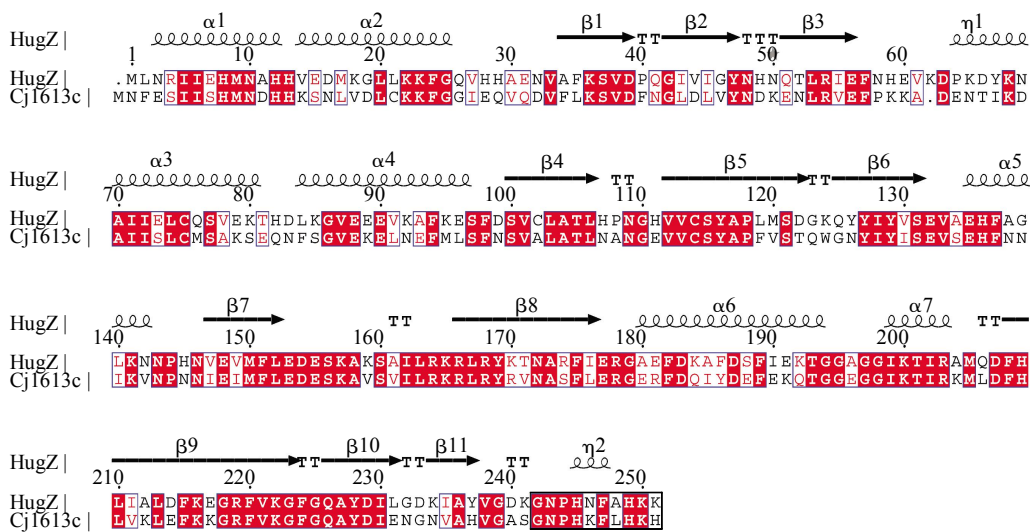


Fig. 2 Sequence alignment of HugZ and Cj1613c

Conservative residues colored in red with His245 and His249 marked by "▲".

红素复合物的浓度, 并从这一系列数值拟合结合曲线计算 HugZ 与血红素的解离常数 K_d . 这些数据表明, H245A/H249A 双位点突变体 410 nm 处吸光度值在 20 $\mu\text{mol/L}$ 血红素浓度时开始趋于稳定, 说明在该血红素浓度下, 蛋白结合血红素的能力趋于饱和, 单位点突变体 H245A 与 H249A 的吸收值在测定范围内始终随血红素浓度上升而增加, 但增加趋势逐渐趋减缓(图 3).

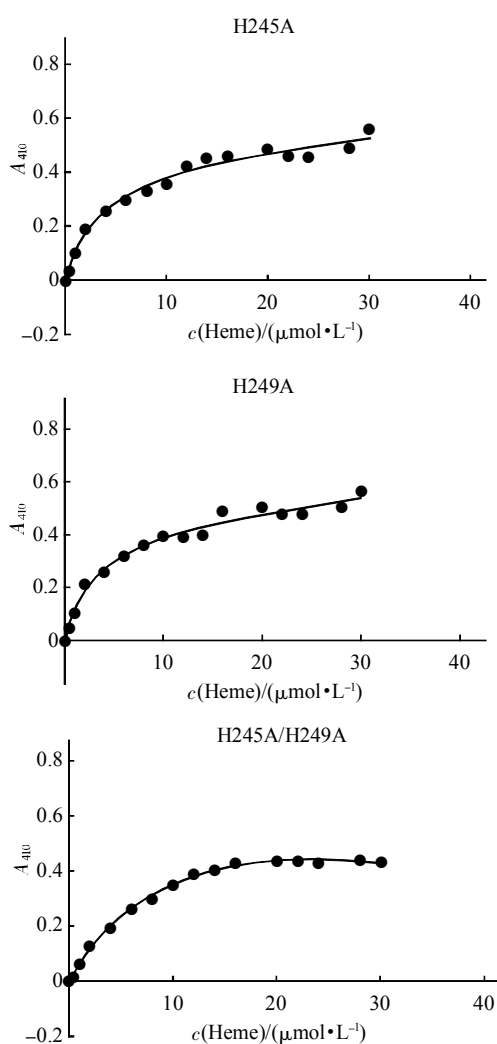


Fig. 3 Visible absorption spectroscopy of HugZ mutants at 410 nm

HugZ 中存在血红素与 His245 结合, 或与 His249 结合的两种可能方式, 但野生型晶体结构显示血红素与 HugZ 结合口袋的结合方式是唯一的, 为此 GraphPad Prism 5 软件拟合数据时我们仍然使用单点结合方式拟合. 拟合结果显示, 双位点突变体 H245A/H249A 的解离常数大于单点突变体 H245A 和 H249A(表 3).

Table 3 Protein-heme dissociation constants for HugZ mutants

Protein	$K_d/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Fitting R Square
H245A	3.7 ± 1.8	0.9857
H249A	2.9 ± 1.0	0.9858
H245A/H249A	15.4 ± 2.9	0.9975

由游离血红素引起的自由基反应对菌体的质膜和 DNA 具有损害作用. 因此, 被摄入致病菌胞内的血红素会立即被胞内血红素结合蛋白所蕴存或由血红素氧合酶降解^[6]. 结合实验结果显示, 柔性 C 端上组氨酸残基的存在提高了 HugZ 结合血红素的能力, 同时降低进入胞内的游离血红素的毒性. H249A 与 H245A 具有相近的解离常数, His249A [$(2.9\pm 1.0) \mu\text{mol/L}$]略低于 H245A [$(3.7\pm 1.8) \mu\text{mol/L}$], 说明 His245 对血红素的亲和力略高于 His249, 而 His245 是血红素的正常结合位点. HugZ 野生型的 K_d 值使用上述光谱方法始终不能获得较好的结果, 这可能是由于 HugZ 存在 His245 和 His249 两个配位位点所致. 血红素通过与 His245 正常配位结合, 进入 HugZ 的血红素结合口袋, 而游离的 His249 残基侧链咪唑基仍可能同时与另一个游离血红素配位结合^[7], 从而引起吸收光谱上的异常变化, 影响了 HugZ 野生型解离常数的测定.

基于以上两个结果, 以含有多个组氨酸残基的柔性 C 端为结构基础的替代作用, 有利于对 HugZ 结合血红素和保持血红素氧合酶活性. 这种利用蛋白质自身残基替代突变残基的结构在结构生物学上也是不多见的.

参 考 文 献

- [1] Unno M, Matsui T, Ikeda-Saito M. Structure and catalytic mechanism of heme oxygenase. *Nat Prod Rep*, 2007, **24**(3): 553-570
- [2] Schuller D J, Wilks A, de Montellano C, *et al.* Crystal structure of human heme oxygenase-1. *Nat Struct Mol Biol*, 1999, **6** (9): 860-867
- [3] Chu G C, Katakura K, Tomita T, *et al.* Histidine 20, the crucial proximal axial heme ligand of bacterial heme oxygenase hmu O from corynebacterium diphtheriae. *J Biol Chem*, 2000, **275** (23): 17494-17500
- [4] Liu Y, Moenne-Loccoz P, Hildebrand D P, *et al.* Replacement of the proximal histidine iron ligand by a cysteine or tyrosine converts heme oxygenase to an oxidase. *Biochemistry*, 1999, **38** (12): 3733-3743

- [5] Wotherspoon A C. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *British Medical Bulletin*, 1998, **54**(1): 79–85
- [6] Guo Y, Guo G, Mao X, *et al.* Functional identification of HugZ, a heme oxygenase from *Helicobacter pylori*. *BMC Microbiology*, 2008, **8**(1): 226
- [7] Hu Y, Jiang F, Guo Y, *et al.* Crystal structure of HugZ, a novel heme oxygenase from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*, 2011, **286**(2): 1537–1544
- [8] Agilent Technology. QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit INSTRUCTION MANUAL. <http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/Public/200521.pdf>
- [9] Rossmann M G, van Beek C G. Data processing. *Acta Crystallographica Section D*, 1999, **55**(10): 1631–1640
- [10] Brunger A T, Adams P D, Clore G M, *et al.* Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica Section D*, 1998, **54** (5): 905–921
- [11] Storoni L C, McCoy A J, Read R J. Likelihood-enhanced fast rotation functions. *Acta Crystallographica Section D*, 2004, **60**(3): 432–438
- [12] Adams P D, Afonine P V, Bunkoczi G, *et al.* PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D*, 2010, **66**(2): 213–221
- [13] Laskowski R A, Rullmann J C, MacArthur M W, *et al.* AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomolecular NMR*, 1996, **8** (4): 477–486
- [14] Ridley K A, Rock J D, Li Y, *et al.* Heme Utilization in *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol*, 2006, **188**(22): 7862–7875
- [15] Schacter B A, Nelson E B, Marver H S, *et al.* Immunochemical evidence for an association of heme oxygenase with the microsomal electron transport system. *J Biol Chem*, 1972, **247**(11): 3601–3607
- [16] Wilks A, Burkhard K A. Heme and virulence: how bacterial pathogens regulate, transport and utilize heme. *Nat Prod Rep*, 2007, **24**(3): 511–522
- [17] Galstyan A, Zaric S, Knapp E W. Computational studies on imidazole heme conformations. *J Biol Inorg Chem*, 2005, **10**(4): 343–354

A Novel Substitution of The Heme-binding Residue Histidine-245 by Histidine-249 in Heme Oxygenase HugZ*

SHEN Xi-Hui^{1,2}, HU Yong-Lin¹, WANG Da-Cheng¹**

¹ National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

² Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract The heme oxygenase HugZ from *Helicobacter pylori* plays essential roles in the colonization of the bacteria in human hosts and is required for the utilization of heme as the sole iron source. Residue His245, which is highly conserved, coordinates the heme iron through its sidechain imidazole group. Surprisingly, this residue was not required for the enzymatic activities of HugZ. To investigate the roles played by His245 in heme binding and enzymatic mechanisms of HugZ, we have solved the crystal structure of HugZ mutant H245A at 2.55 Å resolution and found that a nearby histidine residue, His249, coordinates the heme iron. This substitution is made possible by the fact that both residues 245 and 249 are located in a flexible loop region ranged from Gly239 to the C-terminus. Similar structural features have not been observed in other heme oxygenases so far. We have also performed spectroscopic studies on the heme-binding properties of HugZ and relevant mutants and our results suggest that the flexible C-terminal loop region of HugZ and the presence of multiple histidine residues in this region may play important roles in heme recruiting and in the catalytic mechanisms of HugZ.

Key words *Helicobacter pylori*, heme oxygenase, pathogenic bacteria, iron acquisition, compensation

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00513

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2011CB910304, 2011CB911103) and Key Innovative Project of Chinese Academy of Sciences (KSCW2-EW-J-3).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64888547, E-mail: dcwang@ibp.ac.cn

Received: November 7, 2011 Accepted: December 5, 2011