

突触结合蛋白 I 的胞质片段与磷脂膜的相互作用*

贺雨虹 隋森芳**

(清华大学生物科学与技术系, 生物膜和膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084)

摘要 突触结合蛋白 I 是神经细胞突触囊泡上的一个膜整合蛋白, C2AB 是其具有重要功能的胞质片段. 近年的研究表明, 突触结合蛋白 I 在钙引发的神经递质快速释放过程中起到钙感受器的作用, 它与神经细胞突触前膜的相互作用与其生理功能有关, 但是其作用机制还不清楚. 利用气/液单层膜技术结合荧光发射光谱和圆二色光谱技术, 发现 C2AB 倾向于插入带负电荷的磷脂膜中 (如磷脂酰丝氨酸), 而且插膜是钙依赖性的; 对于不带电荷的磷脂不插膜. C2AB 与膜之间的作用力主要为静电力. 荧光发射光谱和圆二色光谱结果显示, 它与膜相互作用时二级结构不发生显著变化. 结果表明, 突触结合蛋白 I 钙依赖的插入负电荷膜特点, 可以帮助解释其钙感受器的作用机制.

关键词 突触结合蛋白 I, 磷脂单层膜, 临界插膜压

学科分类号 Q6

突触结合蛋白是存在于神经细胞突触囊泡和内分泌细胞中大分泌囊泡上的一类跨膜蛋白, 是囊泡膜的重要组成成分之一, 占囊泡总蛋白质量的 7% ~ 8%, 由一个短的位于囊泡内 N 端、一个单链的跨膜区和一个长的胞质区组成. 突触结合蛋白 I (synt I) 是其中最具有代表性的一个^[1]. 它是 1981 年被发现的^[2], 之后的研究表明它在突触囊泡的外吐过程中起作用. 基因敲除实验证明钙结合 synt I 对于快速、同步的钙引发神经递质释放是至关重要的^[3]. 大鼠的 synt I 分子质量为 65 ku, 由 426 个氨基酸组成, synt I 的胞质区域 (C2AB) 是由高度保守的两个拷贝的 C2 结构域 (靠近囊泡膜的被称为 C2A, 远离的称为 C2B) 组成, 这个结构域与蛋白激酶 C2 调节区是同源的^[4]. synt I 是通过 C2AB 结构域在胞吐过程中和细胞内组分的相互作用来发挥其功能. C2 结构域由约 130 个氨基酸残基组成, 具有非常保守的结构. 每个 C2 结构域折叠成紧密的八链 β 三明治结构, 3 个柔韧的环从结构域的顶端伸出, 其中的 2 个形成一个口袋, 钙离子就结合于此^[5]. 在具有 C2 结构域的一组蛋白质中, C2 结构域经常作为和膜结合的部位. 我们利用气/液单层膜技术来研究 C2AB 和磷脂膜作用的特点, 结合荧光光谱和圆二色光谱技术, 研究和膜结合的 synt I 的结构变化, 并探讨了 synt I 作为钙感受器在分泌囊泡和质膜融合中的可能作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料

磷脂酰胆碱 (PC), 磷脂酰丝氨酸 (PS), 二油酰磷脂酰丝氨酸 (DOPS), 二油酰磷脂酰胆碱 (DOPC) 从 Sigma 公司购买. 谷胱甘肽 (glutathione) -Sepharose 4B 亲和树脂和凝血酶从 Amersham Pharmacia 公司购买. 其他的化学试剂皆为国产分析纯试剂.

1.2 方法

1.2.1 synt I 的 C2AB 片段纯化: 编码 synt I C2AB-GST 融合蛋白的表达质粒由美国 Wisconsin 医学院 Chapman 赠送. 将质粒转入 DH5 α 大肠杆菌细胞中, 扩增培养 ($A = 0.6$) 后, 用 0.1 mmol/L 异丙基硫代 β -D-半乳糖苷 (IPTG) 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 4 h, 离心收集菌体, 重悬于 10 ml 的 TS 缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl) 中, 30 s 超声 3 次, 10 000 r/min 离心 1 h. 上清与 2 ml 谷胱甘肽树脂充分混合, 利用凝血酶酶切吸附在树脂表面的融合蛋白, 得到的水溶蛋白即是 C2AB. 纯度用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 考马斯亮蓝染色为一条约 39 ku 的带.

* 国家自然科学基金资助项目 (30170169).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62772214, E-mail: suisf@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2002-05-30, 接受日期: 2002-08-06

1.2.2 单层膜实验: 单层膜压测量采用 Wilhelmy 吊片法^[6], 吊片宽度 1 cm. 膜天平为 NIMA9000 型 (England). 单层膜表面压力通过测量溶液表面铺展单层膜前后表面张力差求得. 所有数据均由一台 PC 机自动采集记录. 样品槽为自制^[7,8]其容积 4 ml, 表面积 10 cm², 底部放一小磁力搅拌子搅拌亚相. 实验过程中, 先在 Hepes 缓冲液表面铺上一层磷脂单分子层, 膜压稳定后, 蛋白质从样品槽侧面的加样孔中加入到槽底部, 记录膜压的变化直至达到新的平衡. 实验温度控制在 (26 ± 1) °C.

1.2.3 脂质体的制备: 按比例 (DOPC/DOPS = 3:1) 将磷脂溶解在氯仿/甲醇 (3:1) 里, 用 N₂ 吹干, 真空干燥 2 h 后, 加入适量 Hepes 缓冲液, 使磷脂达到 5 g/L. 旋涡振荡 5 min 后, 超声 20 min 至澄清得到超声小单层脂质体 (SUV).

1.2.4 荧光发射光谱检测 C2AB 与膜作用后的结构变化: 测定在 HITACHI-850 型荧光分光光度计上进行, 激发波长为 295 nm, 扫描范围为 310~420 nm. 温度均为 (26 ± 1) °C. C2AB 的浓度为 2 μmol/L, [Ca²⁺] 为 1 mmol/L, 5 g/L 脂质体滴加入蛋白质溶液中直至浓度为 100 μmol/L 和 150 μmol/L, 从所得谱线中扣除脂质体溶液的荧光光谱.

1.2.5 圆二色 (CD) 光谱检测 C2AB 与膜作用后的结构变化: 在日本 Jasco500C 型光谱仪上进行. C2AB 浓度为 1 μmol/L, 脂质体浓度为 200 μmol/L, [Ca²⁺] 为 1 mmol/L, 光径长度为 5 mm, 灵敏度为 0.005°/cm, 扫描范围为 200~250 nm, (26 ± 1) °C 下测定. 记录的 CD 谱经过 8 次叠加平均以提高谱图的信噪比.

2 实验结果

2.1 C2AB 在缓冲液表面自发成膜

为检查 C2AB 的双嗜性, 缓冲液表面压稳定后, 不加入磷脂, 直接往亚相中加入蛋白质, 结果表明 C2AB 具有较强的自发成膜能力, 膜压 (π) 随着蛋白质加入量的增加而上升. 膜压最大值可达 10.8 mN/m, 故以后实验磷脂膜初始膜压均控制在 11 mN/m 以上 (图 1).

蛋白质浓度对膜压变化 ($\Delta\pi$) 的影响: 当磷脂单分子层起始膜压固定时, 随着亚相中蛋白质加入量的增加, $\Delta\pi$ 值也随着增加 (图略). 当亚相中蛋白质浓度达到 150 nmol/L 时, $\Delta\pi$ 达到最大, 随着蛋白质浓度的进一步增加 $\Delta\pi$ 值没有明显的上

升, 故以后实验往亚相中加入蛋白质时均使其浓度达到 150 nmol/L.

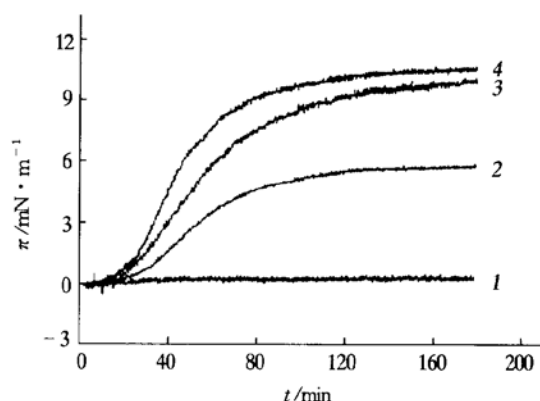


Fig 1 π - t curves for spontaneous penetration of C2AB into an air/water interface

Buffer: 50 mmol/L Hepes, pH 7.4, 100 mmol/L NaCl, The temperature was controlled at (26 ± 0.2) °C. 1: 10 nmol/L; 2: 50 nmol/L; 3: 150 nmol/L; 4: 200 nmol/L.

2.2 C2AB 对带不同电荷磷脂的选择性

Demel 等^[9]证明, 只和磷脂头部基团发生作用的试剂不能引起单层膜表面压力的变化, 故蛋白质加入亚相后引起的膜压变化可以解释为由蛋白质插入磷脂单层膜中引起.

首先测量在有钙时, C2AB 与带不同电荷磷脂作用引起的膜压变化, 以确定 C2AB 插膜的磷脂选择性. C2AB 表现出很强的插酸性磷脂膜能力. 对酸性磷脂 PS, 在起始膜压为 16 mN/m 的情况下, 在亚相中加入 150 nmol/L 蛋白质引起的膜压升高在 5 mN/m 以上, 而加入相同体积的缓冲液, 膜压没有变化. 然而, 对加入中性磷脂 PC 组成的磷脂膜, C2AB 膜压则上升很小 (图略).

Demel 等^[10]证实生物膜膜压值在 31~34 mN/m 范围内. 为了解在该膜压条件下 C2AB 的插膜能力, 我们在不同初始膜压 (π_i) 条件下测量了由蛋白质加入引起的膜压变化 $\Delta\pi$, $\pi_i - \Delta\pi$ 曲线可以用一直线拟合, 其延长线与 π 轴的交点即为临界插膜压值 (π_c), 当膜压高于 π_c 时, 蛋白质不能够插膜, 但蛋白质能够插入膜压低于 π_c 的磷脂膜内.

从图 2 可以看出, 在有钙时, 对于酸性磷脂, C2AB 的 π_c 为 34.7 mN/m, 而对于中性磷脂 PC, C2AB 的 π_c 为 22.1 mN/m. 这表明在生物体条件下, C2AB 倾向于并能够插入富含酸性磷脂膜内, 但不具备插入中性磷脂膜的能力.

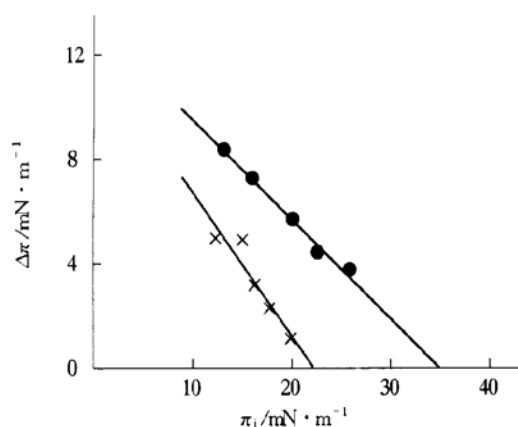


Fig. 2 $\Delta\pi$ - π_i curves of C2AB insertion into the PC, PS monolayers

Buffer: 50 mmol/L Hepes, pH 7.4, 100 mmol/L NaCl, and 1 mmol/L CaCl_2 . The final concentration of C2AB was 150 nmol/L. $\times$ — $\times$: PC; $\bullet$ — $\bullet$: PS.

2.3 钙对 C2AB 插膜的影响

比较亚相分别含 1 mmol/L CaCl_2 和 EGTA 的 Hepes 缓冲液时, C2AB 与磷脂膜作用的临界插膜压 (图 3). 可以看出, 有钙存在时, C2AB 的 π_c 为 34.7 mN/m, 而没有钙时, π_c 仅为 24.9 mN/m. 钙离子增强了 C2AB 插 PS 磷脂膜的能力, C2AB 的插膜呈明显的钙依赖性. 在相同的条件下, 选择了另一个二价离子——镁离子, 可以看出它的 π_c 为 27.3 mN/m, 明显低于钙离子. 可见, C2AB 的插膜也是钙特异性的.

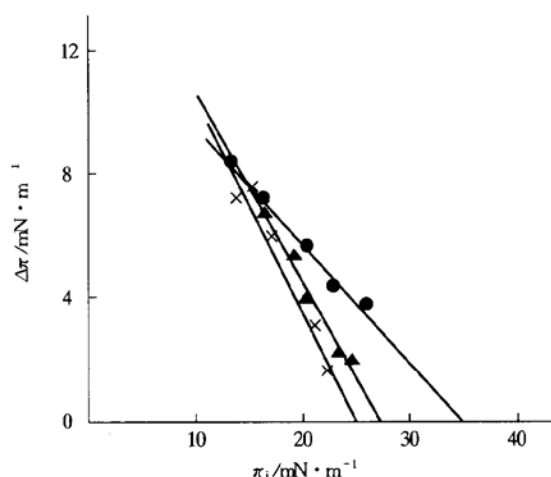


Fig. 3 $\Delta\pi$ - π_i curves of C2AB insertion into the DPPS monolayers in the presence and absence of Ca^{2+} and in the presence of Mg^{2+}

Buffer: 50 mmol/L Hepes, pH 7.4, 100 mmol/L NaCl, and 1 mmol/L MgCl_2 , CaCl_2 , or EGTA respectively. The final concentration of C2AB was 150 nmol/L. $\times$ — $\times$: EGTA; $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$: Mg^{2+} ; $\bullet$ — $\bullet$: Ca^{2+} .

2.4 离子强度对 C2AB 插膜的影响

随着缓冲液中离子强度的增高, 蛋白质插入酸性磷脂膜的能力明显减弱 (图 4), 结果说明静电作用力在 C2AB 与酸性磷脂相互作用中起重要作用.

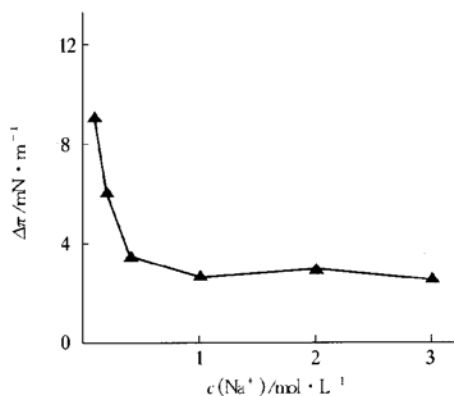


Fig. 4 $\Delta\pi$ - $[\text{Na}^+]$ curve of C2AB interacting with PS monolayers under various sodium concentrations

Buffer: 50 mmol/L Hepes, pH 7.4, 1 mmol/L Ca^{2+} . The final concentration of C2A was 150 nmol/L; the initial surface pressure was (12.0 ± 0.2) mN/m.

2.5 荧光光谱检测 C2AB 与膜作用后的构象变化

色氨酸荧光受吡啶侧链所在的微环境极性影响, 对于研究蛋白质和磷脂膜的相互作用是很有用的. 从图 5 可见, C2AB 与 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 150 $\mu\text{mol/L}$ 的磷脂 SUV 作用后, 内源荧光强度有轻微增高, 但荧光光谱的谱峰未见变化. 说明插膜后, C2AB 的色氨酸微环境的极性未见改变. syt I 有 3 个色氨酸残基, 一个在 C2A 结构域 (Trp259) 上, 另两个位于 C2B

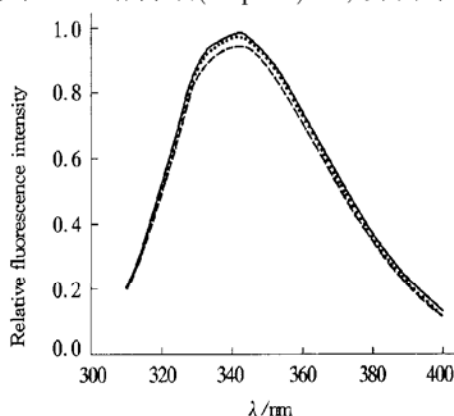


Fig. 5 The effect of liposome on Trp fluorescence of C2AB

The liposome concentrations from the bottom to the top curve are 0, 100, 150 $\mu\text{mol/L}$ respectively. The buffer is 50 mmol/L Hepes with 1 mmol/L Ca^{2+} , and the concentration of C2AB is 150 $\mu\text{mol/L}$. All the experiments are carried out at $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$.

结构域的 Trp380 和 Trp404. 这 3 个都不靠近顶端的环结构, 即 C2 结构域常见的插膜结构. 表明 C2AB 插膜后, 至少未影响到这几个位点的微环境, 说明二级结构变化很小.

2.6 圆二色光谱检测 C2AB 插膜后的构象变化

用圆二色光谱测定 C2AB 与膜结合后的二级构象变化, 从表 1 结果可见, 加入钙和脂质体后 α 螺旋、 β 结构和无规卷曲等成分含量皆变化不明显. CD 光谱的结果也支持了荧光光谱的实验结果. 即 C2AB 插膜后, 结构未发生显著的变化.

Table 1 Comparison of CD spectra of C2AB before and after adding the liposome

	Without liposome	With liposome
Helix/ %	3.9	3.6
Beta/ %	41.5	38.4
Turn/ %	20.1	22.1
Random/ %	34.5	35.9
Total/ %	100.0	100.0

The concentration of the liposome is 200 $\mu\text{mol/L}$ with 1 mmol/L Ca^{2+} . The buffer is 50 mmol/L Hepes, pH 7.4, 100 mmol/L NaCl. The concentration of C2AB is 1 $\mu\text{mol/L}$. All the experiments are carried out at $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$.

3 讨 论

Syt I 蛋白是神经递质释放过程中起调节作用的一个重要蛋白质, 目前认为它在胞吐的膜融合过程中起到钙感受器的作用, 它的胞质片段 C2AB 与磷脂和蛋白质相互作用的研究, 可以帮助深入了解其发挥生理功能的机制. 磷脂单层膜技术是研究蛋白质分子和生物膜的相互作用, 特别是插膜的很好的模型膜系统. 我们第一次利用单层膜技术很直观地证明 C2AB 倾向于插入带负电荷的磷脂, 而且插膜是钙离子依赖性和特异性的, syt I 与膜作用的这一特点为 syt I 在膜融合中作为钙感受器的角色提供了一个有力的解释. C2AB 位于突触前膜活化区的囊泡上, 当信号传至神经细胞, 钙离子浓度迅速增高, C2AB 结合钙, 迅速插膜, C2AB 的插膜可能如同“扳机”将囊泡拉近突触前膜, 同时伴随和 SNARE 蛋白的相互作用^[11], 启动囊泡和突触前

膜的融合和神经递质的释放.

另外实验也表明静电力在 C2AB 与酸性磷脂插膜中起主要作用, 当然可能还有疏水力等其他的力起作用, 而且荧光光谱和圆二色光谱结果显示, C2AB 插膜后, 结构只发生较小的变化. 从其同源蛋白如蛋白激酶 C 与膜作用的晶体结构结果看^[12], C2AB 也可能同样通过结构域顶端环状结构和酸性磷脂膜在有钙的条件下结合. 钙起了一个桥梁作用, 将 C2AB 和磷脂连接起来, 蛋白质的部分侧链插膜, 引起膜压增加. 有关 syt I 通过与膜相互作用调节神经递质的释放机制, 我们目前正在细胞环境下作进一步的工作.

参 考 文 献

- 1 Brose N, Petrenko A G, Sudhof T C, *et al.* Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science*, 1992, **256** (5059): 1021~1025
- 2 Matthew W D, Tsavaler L, Reichardt L F. Identification of a synaptic vesicle specific protein with a wide tissue distribution in neuronal and neurosecretory tissue. *J Cell Biol*, 1981, **91** (1): 257~269
- 3 Fernandez-Chacon R, Konigstorfer A, Gerber S H, *et al.* Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature*, 2001, **410** (6824): 41~49
- 4 Sudhof T C. Synaptotagmins: why so many? *J Biol Cell*, 2002, **277** (10): 7629~7632
- 5 Sutton R B, Davletov B A, Berghuis A M, *et al.* Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca^{2+} /phospholipid binding fold. *Cell*, 1995, **80** (6): 929~938
- 6 Demel R A. Monolayers: description of use and interaction. *Method Enzymol*, 1974, **32** (part B): 539~545
- 7 Han X H, Sui S F, Yang F Y. A minitrough for the study of membrane insertion ability of proteins. *Thin Solid Films*, 1996, **284/285** (1): 789~792
- 8 Mi L Z, Wang H W, Sui S F. Interaction of rabbit C-reactive protein with phospholipid monolayers studied by microfluorescence film balance with an externally applied electric field. *Biophysical J*, 1997, **73** (1): 446~451
- 9 Demel R A, London Y, Geurts van Kessel W S M, *et al.* The specific interaction of myelin basic protein with lipids at the air-water interface. *Biochim Biophys Acta*, 1973, **311** (4): 507~519
- 10 Demel R A, Geurts van Kessel W S, Zwaal R F, *et al.* Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers. *Biochim Biophys Acta*, 1975, **406** (1): 97~107
- 11 Ernst J A, Brunger A T. Biochemical studies of calcium dependent exocytosis: interaction of synaptotagmin with SNARE complex. *Mol Biol Cell*, 2001, **12** (suppl): 2607
- 12 Verdaguer N, Corbalar-Garcia S, Ochoa W F, *et al.* Ca^{2+} bridges the C2 membrane-binding domain of protein kinase C α directly to phosphatidylserine. *EMBO J*, 1999, **18** (22): 6329~6338

Interaction of Cytoplasmic Part of Synaptotagmin I with Phospholipid Membrane*

HE Yu-Hong, SUI Sen-Fang**

(Department of Biological Sciences & Biotechnology, State-Key Laboratory of Biomembrane, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Synaptotagmin I (syt I) is an abundant integral membrane protein of synaptic vesicle and the C2AB domain is the important functional domain in its cytoplasmic part. Recent studies show that C2AB prefers to interact with plasmic membranes of neuron cells *in vivo* and it is believed that such interaction is closely related to the syt I physiological function as a Ca^{2+} sensor in the Ca^{2+} -regulated neurotransmitter release, but the mechanism of the interaction is not clearly understood. Monolayers at an air/water interface combined CD and fluorescence experiments were used to study the characteristic of interaction between C2AB and a phospholipid membrane. The results in the monolayer experiment showed that C2AB domain preferred insertion into the negatively charged phosphatidylserine monolayer and Ca^{2+} ions were required for the interaction. Electrostatic force was mostly responsible for the insertion of C2AB into PS monolayers. Further CD and fluorescence experiments showed that the secondary structure of C2AB domain in the presence or absence of PS/PC liposome had some relatively small change. The experiments provide useful information concerning the important role of syt I as a Ca^{2+} sensor in the fusion of secretory vesicles to the plasma membrane, and better understanding the mechanisms of membrane fusion in exocytosis.

Key words synaptotagmin I (syt I), phospholipid monolayer, critical insertion pressure (π_c)

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30170169).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62772214, E-mail: suisf@mail.tsinghua.edu.cn

Received: May 30, 2002 Accepted: August 6, 2002