

P450cam 突变体蛋白表达、纯化与结晶的改进及其四突变体 (F87L/Y96F/L244A/V247A) 晶体结构

刘斌斌¹⁾ 孙蕾¹⁾ 徐峰¹⁾ 娄智勇¹⁾

庞海¹⁾ L. L. WONG²⁾, 刘一苇¹⁾*

¹⁾清华大学结构生物学实验室, 教育部蛋白质科学重点实验室, 北京 100084;

²⁾Department of Chemistry, Inorganic Chemistry Laboratory, University of Oxford, U. K.)

摘要 在 P450cam 突变体蛋白纯化过程中使用 280 nm/392 nm 双波长比值检测蛋白质纯度, 采用 β -巯基乙醇对蛋白质进行还原性保护, 有效地缩短了纯化进程, 纯化效率相应提高. 以 PEG 8000 为沉淀剂经悬滴汽相扩散法筛选得到适合衍射的 P450cam 四突变体 (F87L/Y96F/L244A/V247A) 晶体, 在 Mar-Research 面探测器系统上收集了 0.22 nm 分辨率的 X 射线衍射数据. 采用同晶差值傅立叶法解析结构, 最后的晶体学 R 因子和 R_{free} 分别为 0.197 和 0.247, 键长偏差为 0.001 77 nm, 键角偏差为 1.96°. 结构测定显示 P450cam 四突变体 (F87L/Y96F/L244A/V247A) 和 P450cam 野生型的整体构象无重大变化, 突变后活性口袋变大而疏水性增加, 这与突变设计预期目标一致.

关键词 P450cam, 四突变体, 纯化, 双波长检测, 晶体结构

学科分类号 O641

细胞色素 P450 酶超家族是广泛分布于自然界的一类外源性单氧化酶. 目前, 在细菌、酵母, 真菌、植物和动物组织中已有超过 500 个 P450 基因被鉴定出来^[1]. 它们共同的一个重要特征是其主要组成 P450 蛋白和 CO 的结合体在 450 nm 处有一个特征性的吸收峰. 由于其可羟化相对惰性的碳氢键, 因而在生物体内 P450 不但催化许多内源性底物, 如脂肪酸、前列腺素、维生素和甾醇等的生物合成与代谢, 而且对激活和灭活包括毒素和原致癌物在内的各种外源化学品也起重要代谢作用^[2].

来源于假单胞菌 *Pseudomonas putida* 的可溶性细胞色素 P450cam, 可羟化相对惰性的单萜 D-樟脑^[1]. 早在 1974 年, 就有学者开始了 P450cam 晶体学的研究, 而 Poulos 等的研究表明, 在硫酸铵体系中 P450cam 结晶大都质量不够好, 形状不规则, 孪晶度高, 不易获得适合衍射的单晶^[3, 4]. P450cam 的三维结构于 1985 年被解析出来后, 有关学者以此为基础探讨了 P450cam 活性口袋附近残基的作用, 这为蛋白质工程改造提供了重要理论基础与方向^[5, 6]. Wong 等^[7]研究发现 P450cam 活性位点中的 96Tyr 被定点突变后, 该酶氧化烷烃、苯乙烯等有机分子的效率有大幅度的提高. 我们与之合作进行了一系列突变体研究, 通过定点突变, 改变 P450cam 活性位点的相关残基, 使之结合并作用于非天然底物或提高其对特定底物的催化活

性^[8]. P450cam 二突变体 (Y96F-V247L) 能较高效率地把非天然产物松萜 (α -Pinene) 氧化为马鞭草烯醇和马鞭草烯酮等有较高经济价值的有机分子, P450cam 三突变体 (F87W/Y96F/V247L) 则对环境污染物 1,3,5-三氯苯 (1,3,5-TCB) 有较好的分解作用, 解析这些突变体蛋白及其复合物的晶体结构, 得到更多的结构位点的信息, 将为 P450cam 的实际应用提供有用的信息^[9, 10], 本文报道了在研究 P450cam 突变体蛋白晶体结构过程中摸索出的一种改进的蛋白质纯化、结晶方法, 此法在本实验室证明也适用于多种 P450cam 突变体蛋白; 同时也报道了 P450cam 四突变体 (F87L/Y96F/L244A/V247A) 0.22nm 分辨率的三维结构.

1 材料和方法

1.1 材料

表达菌株 JM109, 高表达质粒 PCHCX 由本实验室保存. P450cam 四突变体 (F87L/Y96F/L244A/V247A) 基因由牛津大学 Wong 实验室提供. SDS, bisacrylamide 和 acrylamide 购自 Sigma 公司; Hampton Kit 购自 Hampton Research 公司; 各种层析介质均购自 Amersham Pharmacia Biotech

* 通讯联系人.

Tel: 010-62771493, E-mail: liuyiw@xtal.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2004-01-07, 接受日期: 2004-02-28

公司, 其他化学试剂均为国产分析纯产品.

1.2 蛋白质诱导表达

P450cam 四突变体 (F87L/Y96F/L244A/V247A) 表达菌株接种于 10 ml 的 LB 培养基过夜培养, 以 1% 的接种量接种于 1L 的 LB 培养基中, 30℃ 培养至 $A_{280} = 0.6$, 加入樟脑至终浓度 1 mmol/L, 转入 37℃ 热激诱导培养 6 h 后即可收获. 5000 r/min 离心 5 min, 收集菌体.

1.3 蛋白质分离纯化

将收集的菌体以每克湿菌体 10 ml 的比例, 用缓冲液 (40 mmol/L 磷酸钾, 100 mmol/L 氯化钾, pH 6.5, 10 mmol/L β -巯基乙醇, 1 mmol/L 樟脑) 重悬后, 4℃ 下超声破碎裂解细菌, 破碎后的菌体 4℃ 下 15 000 r/min 离心 30 min, 此时就开始加入 β -巯基乙醇以维持体系的强还原性, 樟脑用于稳定蛋白质. 包含蛋白质的上清直接上样 DEAE Sepharose F F 弱阴离子交换柱 (预平衡液及洗脱液为 40 mmol/L 磷酸钾, 100 mmol/L 氯化钾, pH 6.5, 10 mmol/L β -巯基乙醇, 1 mmol/L 樟脑), 用洗脱液洗脱, 由于目标蛋白结合樟脑后在 392 nm 有较强的特征光吸收, 我们在整个纯化过程中, 一直使用 P450cam 四突变体蛋白在 280 nm 和 392 nm 双波长下的吸收情况检测其存在位置和纯度. 收集样品并浓缩后, 上样 Sephadex G-25 凝胶过滤柱 (用缓冲液 40 mmol/L 磷酸钾, pH 7.4, 10 mmol/L β -巯基乙醇, 1 mmol/L 樟脑预平衡, 洗脱). 收集的样品经再次浓缩后, 上样 RESOURCE Q 强阴离子交换预装柱 (用缓冲液 40 mmol/L 磷酸钾, pH 7.4, 10 mmol/L β -巯基乙醇, 1 mmol/L 樟脑预平衡及洗杂蛋白, 用缓冲液 40 mmol/L 磷酸钾, 200 mmol/L 氯化钾, pH 7.4, 10 mmol/L β -巯基乙醇, 1 mmol/L 樟脑洗脱目标蛋白) 得到毫克级目标蛋白纯品. 整个纯化过程要求快速.

1.4 结晶生长

初始结晶条件摸索采用 Hampton Research 的 Kit I 和 Kit II 试剂盒, 以及实验室自己配置的 PEG 4000 Kit 和 PEG 8000 Kit 的稀疏矩阵采样法. 经过对温度、溶液 pH、蛋白质浓度、离子强度、添加剂和沉淀剂等条件的摸索, 获得一种长柱状的晶体, 可基本满足高分辨率的结构解析要求. 晶体生长所用的蛋白质最好是当日制备的新鲜蛋白质. 结晶前 P450cam 突变体蛋白用 Amicon 的 10K 超滤膜将蛋白质所处的缓冲液更换为 100 mmol/L 磷酸钠, 0.2 mol/L 氯化钾, pH 6.5, 这一步处理对能否长出

好的晶体是十分重要的. 最终的结晶条件如下, 甲液: 含 9 g/L P450cam 四突变体 (F87L/Y96F/L244A/V247A) 蛋白溶液; 乙液: 含 0.1 mol/L 磷酸钠、0.2 mol/L 醋酸钠、pH 6.5, 沉淀剂为 18% ~ 24% PEG 8000. 取乙液 200 μ l 作为池液, 甲液与乙液 1:1 共 2 μ l 作悬滴, 291K 温度条件下 1 天左右培养出适合 X 射线衍射的晶体.

1.5 数据收集与处理

P450cam 四突变体 (F87L/Y96F/L244A/V247A) 晶体的数据收集在低温下 (110K) 进行, 数据收集前晶体在含 15% 甘油的防冻液中保存 10 s 后直接在 110K 的氮气流中冷冻. 数据在本实验室的 MAR345 面探测器上收集, 所用的光源为 RIGUKU 的转靶阳极 X 射线发生器, 电压和电流分别为 48 kV 和 98 mA, 波长为 0.154 18 nm. 衍射数据用 HKL 软件包的 DENZO 和 SCALEPACK 程序处理^[11], 结果见表 1.

Table 1 Crystal parameter and data collection statistics

	F87L/Y96F/L244A/V247A
Resolution	0.22 nm
Space group	P2 ₁
Unit cell constant	a = 6.70 nm b = 6.22 nm c = 9.56 nm β = 90.6°
Unique reflections	36 871
R-merge	7.5%
Completeness	98.9%

2 结 果

2.1 结构测定与修正

根据以上的晶胞参数, 最初我们把空间群定为正交晶系的 P2₂1₂1, 一个不对称单位里含有一个分子, 结果在修正时遇到了困难, 后来重新确定空间群为单斜晶系的 P2₁, 即一个不对称单位里含有 2 个分子. 由于本实验室已经成功地完成了二突变体 (F87W/Y96F) 的结构解析工作^[8], P450cam 四突变体 (F87L/Y96F/L244A/V247A) 与二突变体 (F87W/Y96F) 的同晶度很好, 所以用同晶差值傅立叶法解析结构. 用二突变体 (F87W/Y96F) 的坐标为模型, 计算 F_c 和相位, 以四突变体的 (F87L/Y96F/L244A/V247A) 衍射数据为 F_o , 计算

省略该四个突变位点的 $2|F_o| - |F_c|$ 和 $|F_o| - |F_c|$ 电子密度图, 从差值图中可分辨出相应突变位置的侧链密度发生了变化, 其形状与突变后残基相当 (图 1). 根据电子密度图调整相应残基, 得到四突变体的初始模型.

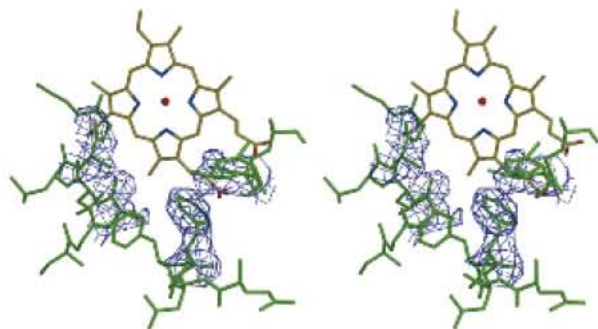


Fig. 1 The electron density map of F87L/Y96F/L244A/V247A mutant of cytochrome P450cam

利用 CNS 程序进行结构修正, 第一次用模拟退火法修正坐标和整体温度因子, 在 SGI 图形工作站上用 O 程序调整模型. 每次调整模型后都用能量优化法进行修正, 修正过程采用 R 因子和 R_{free} 因子做指标检测修正结果, 多次反复循环修正, 再进行单个温度因子修正, 加水分子修正, 直至 R 因子收敛. 修正完成后, 最终晶体学 R 因子为 0.197, R_{free} 因子为 0.247. 结构模型与电子密度图吻合良好, 经 PROCHECK 检验, 大部分残基 (85.7%) 的二面角落在了最适宜的区域, 小部分晶体残基 (14.3%) 的二面角落在了适宜区域, 没有二面角落在不允许区域; 键长、键角的标准偏差分别为 0.001 77 nm 和 1.96° , 原子间没有过近接触. 这表明该结构的立体构象和二面角分布合理, 最后结果见表 2.

Table 2 F87L/Y96F/L244A/V247A mutant of cytochrome P450cam refinement statistics

	F87L/Y96F/L244A/V247A
Resolution	5.0 ~ 0.22 nm
R-factor	0.197
R-free factor	0.247
Added water molecules	331
r. m. s bond length	0.001 77 nm
r. m. s bond angle	1.96°

2.2 结构描述与比较

在 P450cam 四突变体 (F87L/Y96F/L244A/V247A) 晶体结构的一个不对称单位中, 存在有两个分子, 每个分子由 414 个残基组成, 其中前 10 个残基不可见, 没有密度; 每个分子中含有一个卟啉环 (图 2). 将其 $C\alpha$ 链和野生型 P450cam 的 $C\alpha$ 链叠合, 得到的 r. m. s 偏差为 0.04 nm, 说明四突变体 (F87L/Y96F/L244A/V247A) 与野生型 P450cam 整体结构十分相似, 也能低效率羟化樟脑底物 (结果另文发表). 图 3 为 P450cam 四突变体 (F87L/Y96F/L244A/V247A) 的 4 个突变位点与野生型 P450cam 相应部分的迭合图. 活性中心其他残基的位置和取向都基本没有改变, 87 位的 Leu 的侧链灵活性增强, 更向卟啉环方向靠近, 96 位 Tyr 突变成 Phe 后侧链构象没有发生变化, 只是前面的羟基消失, 失去了极性. 可以推测, 这对催化樟脑这类含有氧的底物立体特异性选择作用减弱. 244 位与 247 位分别由 Leu 和 Val 突变成 Ala 后, 其侧链方向没有改变, 而侧链长度变短, 这有利于包容体积较大的底物分子. 总之, 从结构上看, 使 P450cam 活性口袋疏水性增强并且容积变大的突变目标顺利实现, 其中突变位点的变化见图 3.

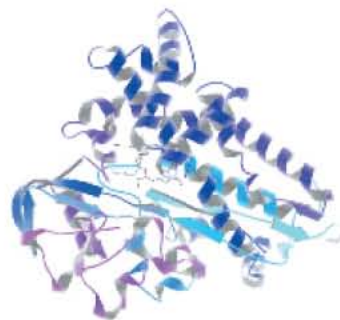


Fig. 2 A ribbon representation of the F87L/Y96F/L244A/V247A mutant of cytochrome P450cam

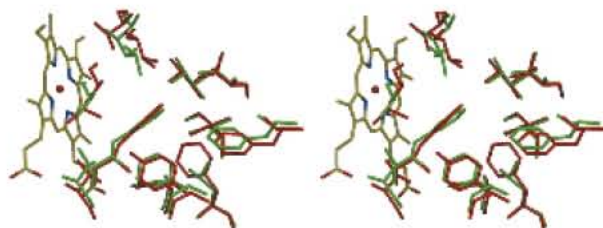


Fig. 3 Superposition of F87L/Y96F/L244A/V247A mutant and P450cam near active pocket

3 讨 论

我们曾经参考已有的文献结果去寻找合适的 P450cam 突变体蛋白结晶条件, 但没有获得理想结果^[5, 6]. Poulos 等^[3] 研究表明, 在硫酸铵体系中 P450cam 晶体大都质量不够好, 形状不规则, 孪晶度高, 不易获得适合衍射的单晶. 在实践中, 我们也碰到过上述问题, 在确定了以 PEG 8000 为沉淀剂的结晶体系后, 经过大量摸索, 反复比较, 通过对蛋白质纯化与结晶作了适当改进后, 较理想地解决了上述问题.

3.1 纯化过程中加入樟脑与采用 280 nm/392 nm 双波长比值检测蛋白质纯度

在摸索 P450cam 突变体蛋白结晶条件的过程中, 曾经按照一般的蛋白质纯化思路来纯化 P450cam 突变体蛋白样品, 试验了很长时间仍难以长出高质量的蛋白质单晶. 实践中发现, 最好采用破菌后 24 h 内得到的高纯度蛋白质样品来做结晶实验, 所以样品纯化过程要迅速快捷. 此外, 实践中发现在纯化时往样品中加适当浓度的樟脑对后续的蛋白质晶体生长实验有利, 同时也还发现样品中存在樟脑的量对 P450cam 突变体蛋白晶体形状大小、衍射能力等密切相关, 经试验发现加入 1 mmol/L 的樟脑比较理想. 通过监测 P450cam 突变体蛋白在 280 nm 和 392 nm 双波长下的吸收情况检测其存在位置和纯度, 只有 A_{280}/A_{392} 的比值小于 1.10 的蛋白质才用于结晶实验, 实践证明这样有效地加快了蛋白质纯化进程, 有利于后继结晶实验的进行, 同时也使样品纯度提高到 95% 以上, 为获得高质量的蛋白质单晶打下有力的基础.

3.2 纯化过程中用 β -巯基乙醇保持体系的还原性

P450cam 蛋白含有 6 个半胱氨酸, 从它的三维结构可以看出有 5 个半胱氨酸位于蛋白质表面, 一个半胱氨酸位于活性口袋, 保护它们的巯基在纯化过程中不受氧化, 避免非天然二硫键形成, 对后继的晶体生长是至关重要的. 文献报道在纯化和结晶 P450cam 蛋白过程中加入适当浓度二硫苏糖醇能获得有效的还原性保护^[3]. 开始我们也用二硫苏糖醇作了大量尝试, 结果不太理想, 后来改用 β -巯基乙醇. 在细胞破碎开始, 我们就在样品溶液及缓冲液中加入 10 mmol/L β -巯基乙醇, 并在纯化过程中及时补充 β -巯基乙醇以保持溶液体系的强还原性, 这样得到大的蛋白质单晶几率更多, 而且用 β -巯基乙醇后所得到的晶体其耐 X 射线辐射的程

度也优于用二硫苏糖醇所得到的晶体. 推测 β -巯基乙醇不存在类似二硫苏糖醇与 P450cam 的结合作用^[3, 4], 可能更有利于 P450cam 突变体蛋白纯化过程中的还原性保护.

3.3 结晶前磷酸缓冲体系改换成胍酸钠缓冲体系

由于在蛋白质纯化过程中所用含 1 mmol/L 樟脑的磷酸缓冲液是用于稳定蛋白质, 而实践中发现含有樟脑的样品长出晶体形状很不规则且衍射质量差, 因此在结晶前用 Amicon 的 10K 超滤膜将蛋白质所处的磷酸缓冲液及樟脑更换成 100 mmol/L 胍酸钠缓冲液, 对于是否能获得可用于 X 衍射数据收集的大单晶非常重要, 而在纯化过程中使用的磷酸钾缓冲液是有利于酶蛋白结合樟脑的^[4], 最后获得的晶体其活性位点中经证明不含底物樟脑.

3.4 四突变体分子的活性口袋变大而疏水性增强

对比四突变体 (F87L/Y96F/L244A/V247A) 与天然 P450cam 的晶体结构发现, 四突变体 (F87L/Y96F/L244A/V247A) 活性中心的残基变化不大, 整个活性口袋的疏水性增强而容积变大, 这与四突变体 (F87L/Y96F/L244A/V247A) 催化底物分子菲效率较野生型 P450cam 有明显提高的生化试验结果是一致的^[12]. 当 87Phe 突变为 Leu 后, Leu 可能更有利于灵活地固定于催化底物菲; 96Tyr 突变为 Phe, 苯丙氨酸的苯环比酪氨酸的酚羟基疏水性增加而极性消失, 对结合非极性分子菲有利. 生化实验也显示, P450cam 单突变体 (F87L) 和二突变体 (F87L/Y96F) 耦联 NADH 效率分别比野生型 P450cam 要高 6% 和 15%^[12]. 此外, 有研究认为 87Phe 和 96Tyr 的侧链是底物通道的一部分^[4], 87Phe 和 96Tyr 分别被 Leu 与 Phe 替代, 通道的疏水性增加, 也促进了强疏水性底物分子菲的进入. 定点突变结果表明, V247 是制约 P450cam 催化底物范围与活性的关键残基之一^[7]. 突变为 Ala 后, 活性口袋空间增加对结合并包容底物菲是有利的. V244 突变为 Ala 可能也使体积较大底物分子有足够的空间采取适宜的结合方向, 从而提高耦联效率^[13]. 为进一步了解突变体结合底物后的构象变化, 我们也在进行四突变体结合底物菲的复合物晶体学研究, 由于菲的强疏水性, 在缓冲液中溶解度很小, 目前尚未得到复合物的晶体.

参 考 文 献

- 1 Ortiz de Montellano P R. Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry, New York: Plenum Press, 1995. 456 ~ 473
- 2 Nelson S R, Koymans L, Nebert D W, et al. P450 superfamily:

update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 1996, **6** (5): 1~42

3 Poulos T L. Cytochrome P450. *Curr Opin Struct Biol*, 1995, **5** (6): 767~774

4 Hasemann C A, Peterson J A, Deisenhofer J. Crystal structure and refinement of cytochrome P450terp at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol*, 1994, **236** (4): 1169~1185

5 Poulos T L, Finzel B C, Gunsalus I C, *et al.* The 2.6 Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *J Biol Chem*, 1985, **260** (30): 16122~16130

6 Cupp-Vickey J E, Poulos T L. Structure of cytochrome P450eryf involved in erythromycin biosynthesis. *Nature Struct Biol*, 1995, **2**: 144~153

7 Nickerson D P, Harford-Cross C F, Wong L L, *et al.* The catalytic activity of cytochrome P450cam towards styrene oxidation is increased by site-specific mutagenesis. *FEBS Lett*, 1997, **405** (2): 153~156

8 Bell S G, Chen X, Xu F, *et al.* Molecular recognition in (+)- α -pinene oxidation by cytochrome P450cam. *Biochem Soc*

Trans, 2003, **31** (Pt 3): 558~562

9 Chen X, Christopher A, Jones J P, *et al.* Crystal structure of the F87W/Y96F/V247L mutant of cytochrome P-450cam with 1,3,5-trichlorobenzene bound and further protein engineering for the oxidation of pentachlorobenzene and hexachlorobenzene. *J Biol Chem*, 2002, **277** (40): 37519~37526

10 Bell S G, Chen X, Sowden R J, *et al.* Molecular recognition in (+)- α -pinene oxidation by cytochrome P-450cam. *J Am Chem Soc*, 2003, **125** (3): 705~714

11 Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol*, 1997, **276**: 307~326

12 Charles F, Angus B, Fiona K, *et al.* Protein engineering of P-450cam (CYP101) for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Protein Engineering*, 2000, **13** (2): 121~128

13 Raag R, Poulos T L. The structural basis for substrate-induced changes in redox potential and spin equilibrium in cytochrome P-450cam. *Biochemistry*, 1989, **28** (2): 917~922

The Improved Procedure for The Expression, Purification and Crystallization of Mutants of Cytochrome P450cam and The Crystal Structure of The F87L/Y96F/L244A/V247A Mutant

LIU Bin-Bin¹⁾, SUN Lei¹⁾, XU Feng¹⁾, LOU Zhi-Yong¹⁾,

PANG Hai¹⁾, L. L. WONG²⁾, LIU Yi-Wei^{1)*}

¹⁾ Ministry of Education Laboratory of Protein Science & Laboratory of Structural Biology, Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

²⁾ Department of Chemistry, Inorganic Chemistry Laboratory, University of Oxford, U. K.)

Abstract The UV absorbance ratio (A_{392}/A_{280}) was developed to survey the purity of the P450cam mutant protein during the purification of the mutants protein. Thus the course of the purification became compact and the efficiency of the purification had been improved. β -Mercaptoethanol had been developed to maintain the deoxidization of the protein during the purification. Crystals of the F87L/Y96F/L244A/V247A mutant were grown by vapor diffusion method. X-ray diffraction data were collected to 0.22 nm resolution on a Mar Research area detector in house. The structure was determined by Difference Fourier Method. The final crystallographic R factor and R_{free} factor are 0.197 and 0.247 respectively. The RMS deviations of bond length and angle of the mutants are 0.00177 nm and 1.96° respectively. Structure comparison indicates that there is no obvious conformational change between P450cam and the F87L/Y96F/L244A/V247A mutant. After mutation, the structure of the active pocket became larger but its hydrophobicity increased, which are consistent with the aim of mutation.

Key words P450cam, four mutants, purification, double UV check, crystal structure

* Corresponding author.

Tel: 86-10-62771493, E-mail: liuyiw@xtal.tsinghua.edu.cn

Received: January 7, 2004 Accepted: February 28, 2004