

肌红蛋白与 H₂S 反应的结构功能学研究*

吴云翔 易 军**

(南京理工大学环境与生物工程学院, 南京 210094)

摘要 近年来, 内源性 H₂S 作为第 3 种被发现的新型气体信号分子, 其生理学作用逐渐受到研究者的重视. 在哺乳动物体内, H₂S 与血红素蛋白的结合有两种方式, 一种是 H₂S 直接键合血红素中心 Fe 形成 Fe-H₂S 复合物; 另一种则是 H₂S 修饰血红素卟啉环, 形成硫代血红素结构. 我们选用肌红蛋白(myoglobin, Mb)作为研究对象, 通过点突变技术改变了血红素活性中心结构, 结合紫外-可见光谱学以及 X-射线晶体学, 研究了 H₂S 与不同突变型 Mb 反应后的光谱和结构变化. 结果显示: 血红素中心近、远端腔微环境的变化, 如腔体极性、氢键数目、氢键位置等因素直接影响蛋白质与 H₂S 的结合, 以及硫代血红素(sulfheme)的形成. 这些结果为研究血红素蛋白参与内源性 H₂S 代谢机理提供了重要的实验数据.

关键词 气体信号分子, 硫化氢, 肌红蛋白, 硫代血红素, 活性中心

学科分类号 Q71

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0047

长期以来, 人们普遍认为 NO、CO、H₂S 等无机气体分子均为气体污染物, 对人体具有毒害作用. 然而, 随着研究发现, 这些气体分子能够在生物体内源性的产生, 并作为信号分子在生命活动过程中发挥重要的调节作用, 这一发现开创了以气体信号分子为研究对象的新研究领域^[1]. H₂S 作为第 3 种被发现的气体信号分子, 其相关研究已经受到研究者的重视^[2]. 内源性 H₂S 主要是通过胱硫醚 β 合成酶、胱硫醚 γ 裂解酶, 以半胱氨酸为底物产生; 或者通过 3-巯基丙酮酸硫基转移酶, 以高半胱氨酸为中间体, 由甲硫氨酸经过转硫作用产生^[3]. 作为内源性信号分子, H₂S 发挥类似于神经递质的中枢调节作用, 参与学习和记忆的调节, 也能够协同 NO, 调节血管的舒张和收缩, 参与心血管疾病的调控, 同时 H₂S 还可以通过抗氧化作用、抗炎作用等影响人体的呼吸系统和内分泌系统^[4-5].

在生物体内, 内源性 H₂S 能够与一系列生物靶点结合, 从而发挥其生理功能, 这些生物靶点主要为巯基化合物、血红素蛋白以及其他金属蛋白^[6]. 研究发现, 血红素蛋白是调节内源性气体信号分子的重要载体, 而血红蛋白(hemoglobin, Hb)和肌红蛋白(myoglobin, Mb)作为哺乳动物体内广泛存在的血红素蛋白, 能够与内源性 H₂S 分子反应结合,

起到调控体内 H₂S 浓度的作用^[7]. 在与 H₂S 分子的反应中, Hb 和 Mb 均能形成两种不同的产物, 其中一种是绿色复合物, 被称为硫代血红素(sulfheme)^[8-9], 另一种是 H₂S 直接配位结合于血红素中心的 Fe^{III} ^[10-11]. 研究发现, 这两种结合方式受到血红素活性中心的近、远端腔体环境影响^[12-14]. 目前, 关于 H₂S 与哺乳动物血红素蛋白反应的晶体结构研究还很少, Evans 等^[15]在 1994 年报道了第一个 sulfMb 结构, 而直到 2017 年, Vitvitsky 等^[11]才报道了第一个 H₂S 键合于血红素中心 Fe 的 Hb 晶体结构, 这些结构信息的缺乏使得从分子层面认识血红素蛋白参与调控 H₂S 代谢机理变得困难.

Mb 是由 153 个氨基酸残基和一个血红素辅基构成的单体蛋白质, 其分子质量仅有 17 ku, 具有良好的水溶性和稳定性, 能够在原核生物的表达系统中进行大量表达, 并且易于纯化, 因此 Mb 常常作为代表性蛋白质用来研究血红素蛋白的结构和功能. 我们以 Mb 为研究对象, 通过对血红素活性中

* 国家自然科学基金资助项目(21271104, 21671103).

** 通讯联系人.

Tel: 025-84303273, E-mail: yijun@njust.edu.cn

收稿日期: 2018-02-01, 接受日期: 2018-04-17

心腔体附近的氨基酸进行点突变, 成功构建得到 Mb 的突变型 H93M、V68A/I107Y, 然后采用紫外 - 可见光谱以及 X- 射线晶体衍射技术分析突变型 Mb 与 H₂S 的反应, 所得光谱数据和晶体结构数据可解析血红素活性中心结构变化对 Mb 与 H₂S 结合的影响, 为研究血红素蛋白参与内源性 H₂S 代谢机理提供重要的实验数据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 表达菌株和表达载体

实验采用的表达载体为含野生型 Mb 基因的 pGYM 质粒, 表达菌株为 *E.coli* BL21(DE3).

1.1.2 试剂

DNA 聚合酶 pfu、限制性核酸酶 *Dpn* I 均购自上海生工生物工程股份有限公司.

1.2 方法

1.2.1 突变型 Mb 质粒的构建

制备 2 种不同的 Mb 突变型 H93M、V68A/I107Y. 制备突变型 H93M 质粒所用引物为 5' GTTTAGTAGCCATCGATTGCGCCAAGC 3' 和 5' GCTTGC GCAATCGATGGCTACTAAAC 3', 以野生型 Mb pGYM 为模板扩增得到. 制备突变型 V68A/I107Y (AY)质粒所用引物为 5' CTAGGGCA-GTTAACGCAACGGTACCATG 3' 和 5' CATGG-TACCGTTGCGTTAACTGCCCTAG 3', 以野生型 Mb pGYM 为模板扩增得到突变型 V68A 质粒; 然后使用引物 5' GATCAAATACCTGGAATTCTACTCTGATGCGATCATCCAC 3'和 5' GTGGATGATCGCATCAGAGTAGAATTCCAGGTATTTGATC 3' 以突变型 V68A 质粒为模板扩增得到突变型 V68A/I107Y 质粒. 扩增得到的质粒使用 *Dpn* I 酶处理后直接转化至 *E.coli* DH5 α 细胞中, 涂布 LB 平板(含 100 mg/L 氨苄青霉素), 37℃过夜培养后挑取单菌落, 接种至 5 ml LB 培养基中(含 100 mg/L 氨苄青霉素), 37℃、220 r/min 过夜培养, 提取质粒测序验证.

1.2.2 突变型 Mb 的表达

将质粒转化至 *E. coli* BL21(DE3)细胞中, 涂布 LB 平板(含 100 mg/L 氨苄青霉素), 37℃过夜培养后挑取单菌落, 接种至 10 ml TB 培养基(含 100 mg/L 氨苄青霉素), 37℃、220 r/min 过夜培养. 然后按照体积比 1:100 接种至 1 L TB 培养基(含 100 mg/L 氨苄青霉素)于挡板三角瓶中培养, 37℃、150 r/min

培养 20 h. 离心(4 000 r/min, 15 min, 4℃)弃去上清收集菌体, 菌体呈红棕色.

1.2.3 突变型 Mb 的纯化

向红棕色的菌体沉淀中加入一定量的裂解液(50 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 4℃ pH 8.6, 10 v/w), 使用匀浆机重悬并混匀菌体, 然后向菌液加入少量的 DNase、RNase 以及 PMSF (终浓度 0.1 g/L)、胰蛋白酶抑制剂(aprotinin, 终浓度 2 mg/L). 使用超声波细胞破碎仪对菌体进行破碎, 参数设置为功率 65%, 超声 2 s/ 间隔 3 s, 10 min. 菌体破碎完全后, 离心(15 000 g, 45 min, 4℃), 弃去菌体碎片沉淀, 上清含有 Mb 呈红色. 将上清液冰浴搅拌混匀, 同时缓慢加入固体(NH₄)₂SO₄ 至浓度为 65%, 然后继续冰浴搅拌 1 h. 离心(15 000 g, 1 h, 4℃), 弃去沉淀的杂质蛋白质, 上清含有 Mb 呈红色. 将上清液冰浴搅拌混匀, 同时缓慢加入固体(NH₄)₂SO₄ 至浓度为 95%, 然后继续冰浴搅拌过夜. 最后, 离心(15 000 g, 1 h, 4℃)弃去基本呈无色的上清液, 得到包含 Mb 的红色蛋白沉淀.

用少量的缓冲液 A(5 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 4℃ pH 8.6)重悬上步沉淀蛋白质, 转移至截留分子质量 7 ku 的透析袋中, 在 4℃下透析于 2 L 缓冲液 A 溶液中, 每 4 h 更换一次透析液. 透析完成后的蛋白质通过离心(15 000 r/min, 10 min, 4℃)去除沉淀, 然后在 4℃环境下, 加入到已经使用缓冲液 A 预平衡好的 DEAE 柱(2.5 cm×25 cm)中, 设置流速为 1 ml/min. 首先使用缓冲液 A 清洗, 洗脱无法绑定的杂质蛋白质, 通过 280 nm 处的紫外吸收峰值确认杂质蛋白质洗净. 然后更换为缓冲液 B(5 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, 4℃ pH 8.6)清洗, 洗脱 Mb, 通过 280 nm 处的紫外吸收峰值确定蛋白质流出和流尽, 并对流出蛋白质进行分部收集. 蛋白质收集完毕后采用 SDS-PAGE 电泳和紫外 - 可见光谱对分步收集的组分进行分析, 合并 Mb 纯度较高的组分, 并根据组分的紫外 - 可见光谱补加适量的血红素, 使得 Soret 带与 280 nm 吸收峰值的比值大于 2, 然后使用蛋白质浓缩装置浓缩蛋白质至约 1 ml.

对上步浓缩的蛋白质进行离心(15 000 r/min, 10 min, 4℃)去除沉淀, 然后在 4℃环境下, 加入到已经使用缓冲液 C(20 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 4℃ pH 8.6)预平衡好的 G75 柱(2.5 cm×50 cm)中, 设置流速为 0.5 ml/min. 使用缓冲液 C 继续洗脱, 通过 280 nm 处的紫外吸收峰值确定蛋

白质流出和流尽, 并对流出蛋白质进行分部收集. 蛋白质收集完毕后采用 SDS-PAGE (12%)电泳对分步收集的组分进行分析, 合并 Mb 纯度较高的组分, 使用蛋白质浓缩装置浓缩蛋白质至约 30 g/L, 最后使用 SDS-PAGE (12%)和 Native-PAGE (12%)确保最终得到的蛋白质纯度大于 90%.

1.2.4 Mb 与 H₂S 反应的紫外 - 可见光谱

在生理条件下, Na₂S 溶液接近于 H₂S 在水溶液中的状态, 选用 Na₂S 溶液作为 H₂S 供体, 与 Mb(野生型 Mb, 突变型 H93M、V68A/I107Y)进行反应.

a. 高铁型 Mb 与过量 Na₂S 反应的紫外 - 可见光谱: 取 1 cm×1 cm 的石英比色皿, 加入 3 ml 已超声脱气的 PBS (0.1 mol/L, pH 7.4)溶液, 然后根据 Mb 的浓度, 取适量体积于 PBS 溶液中混匀以形成 10 μmol/L 的 Mb 溶液, 于紫外 - 可见光度计测定其在 250~700 nm 区间的全波长光谱. 再加入 3.5 μl 的 Na₂S 溶液(0.086 mol/L)(Mb 与 Na₂S 的摩尔比为 1:100), 混匀后立刻测定其在 250~700 nm 区间的全波长光谱, 1 h 内测定并记录每分钟的光谱.

b. 在 H₂O₂ 存在条件下, Mb 与 Na₂S 反应的紫外 - 可见光谱: 取 1 cm × 1 cm 的石英比色皿, 加入 3 ml 已超声脱气的 PBS (0.1 mol/L, pH 7.4)溶液, 然后根据 Mb 的浓度, 加入适量体积 Mb 于溶液中混匀以形成 10 μmol/L 的 Mb 溶液, 于紫外 - 可见光度计测定 250~700 nm 区间的全波长光谱. 然后加入 1.2 μl H₂O₂ 溶液(0.1 mol/L), 混匀后每分钟测定并记录 250~700 nm 区间的全波长光谱, 直至 Soret 带的偏移稳定. 再加入 2 μl 过氧化氢酶(catalase, 1 g/L), 混匀后静置 2 min 以分解过量的 H₂O₂. 最后, 加入 0.9 μl Na₂S 溶液(0.05 mol/L), 混匀后 1 h 内每分钟测定并记录 250~700 nm 区间的全波长光谱.

1.2.5 突变型 Mb 的结晶

根据已发表的 Mb 结晶条件, 选用(NH₄)₂SO₄ 作为沉淀剂, 在 25℃ 下采用悬滴法制备突变型和野生型 Mb 晶体. 具体操作如下: 将 500 μl 含沉淀剂(NH₄)₂SO₄ (2.5~3.0 mol/L, 共 5 个梯度)、Tris (0.1 mol/L, 25℃ pH 7.0~9.0, 共 5 个梯度)和 EDTA (1 mmol/L)的结晶液加入至 24 孔结晶板的孔槽中(总共 25 个条件). 然后取 4 μl Mb 溶液 (~30 g/L)与等体积的结晶液混合于硅化玻片上, 再倒置盖在含有润滑脂的对应孔槽上, 向下压紧密

封后于 25℃ 恒温箱中静置待晶体生长. 合适结晶条件下, 1d 后即可在显微镜下观察到片状晶体的生长, 1w 后晶体生长达到稳定状态.

获得晶体后, 采用晶体浸泡法制备 Mb 与 H₂S 反应的晶体, 将合适的晶体浸泡于含 2 mmol/L Na₂S 的冻存液(冻存液是在对应结晶液的基础上提高 0.2 mol/L 的沉淀剂浓度, 并加入 15% 的甘油), 静置 10 min, 然后迅速将其转移至液氮中速冻保存.

1.2.6 晶体数据收集与结构解析

晶体衍射图像是在中国科学院上海应用物理研究所(BL19U1 生物大分子晶体学光束站)以及俄克拉荷马大学生命科学中心的 X- 射线衍射仪(型号为 Rigaku MSC RU-H3R)上采集的, 利用 HKL2000 软件中的 Index 程序确定晶体的晶胞参数和空间群, 对衍射图像进行 Intergrate 和 Scale 处理, 以获得 Output.sca 数据文件. 经 X- 射线衍射数据收集后, 采用分子替换法获取相位信息, 然后使用 REFMAC 软件进行反复结构精修, 使用 COOT 软件进行可视化模型构建及结构修正, 并确定模型中溶剂分子 H₂O 的位置. 最终获得高铁型的突变型 Mb H93M (分辨率 1.80Å), 以及 AY-H₂S (分辨率 1.90Å)的蛋白质模型, 具体信息见表 1 所示.

Table 1 X-ray data collection and refinement statistics

	Mb H93M aquomet	Mb AY-H ₂ S
Data collection		
PDB ID	5Z7E	5Z7F
Space group	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁
Unit cell parameters /Å	35.1, 28.7, 63.3	35.0, 28.5, 62.7
Angle/β°	(105.8)	(105.6)
Resolution range/Å	60.89-1.80	60.38-1.90
Average multiplicity	3.3 (2.5)	3.1 (3.0)
Completeness/%	99.5 (98.59)	96.98(90.22)
<i>I</i> /σ(<i>I</i>)	29.4 (7.6)	15.4 (4.0)
R _{merge}	0.054 (0.46)	0.067(0.178)
Refinement		
Number of protein atoms	1239	1239
Number of heteroatoms	102	76
R _{factor}	0.158	0.167
R _{free}	0.197	0.227
R.m.s.d. from Ideal Values		
Bond lengths/Å	0.018	0.017
Bond angles/(°)	1.783	1.845
Ramachandran plot/%		
Preferred region	98.0	96.69
Allowed region	2.0	3.31
Outliers	0	0

2 结果与讨论

2.1 突变型 Mb 及 Mb-H₂S 的晶体结构

2.1.1 突变型 H93M 的活性中心结构

Mb 是由 153 个氨基酸残基和一个血红素辅基构成的单体蛋白质, 其分子质量约为 17 ku. 在 Mb 三维结构中, 整个多肽主链由 8 段 α 螺旋结构构成, 分别命名为 A~H 链(图 1a), Mb 分子中 77% 的氨基酸残基都处于 α 螺旋区域. 而未形成螺旋的肽链则以转角结构连接着 8 个 α 螺旋, 使得 Mb 整体呈球状结构. 在该球状结构中, B、C、E、F、G 链环绕构成空腔, 并结合 1 个血红素作为蛋白质辅基. Mb 的生理学功能主要是由血红素以及两端腔体环境共同作用产生的, 该部位通常称

为 Mb 的活性中心.

在已发表的野生型 metMb(PDB ID: 1WLA)的血红素活性中心结构中(图 1b), 血红素 Fe 原子处于 6 配位结构. 在近端腔体, 血红素 Fe 原子与 His93 的 N 原子通过共价键结合, Fe-N 的键长为 2.1Å; 血红素的吡咯 A 环上的丙酸羧基与 F 螺旋的 Ser92 的侧链羟基形成稳定氢键(2.7Å). 在远端腔体, 存在 1 个 H₂O 分子与 Fe 原子配位结合, Fe—O 键长为 2.2Å, 同时该 H₂O 分子和远端 His64 形成氢键(2.8Å). 血红素的吡咯 D 环上的丙酸羧基基团与 C~D 螺旋上的 Lys45 以及 1 个 H₂O 分子分别形成氢键. 这些共价键和氢键的存在, 使得血红素稳定处于 Mb 的中央腔体中.

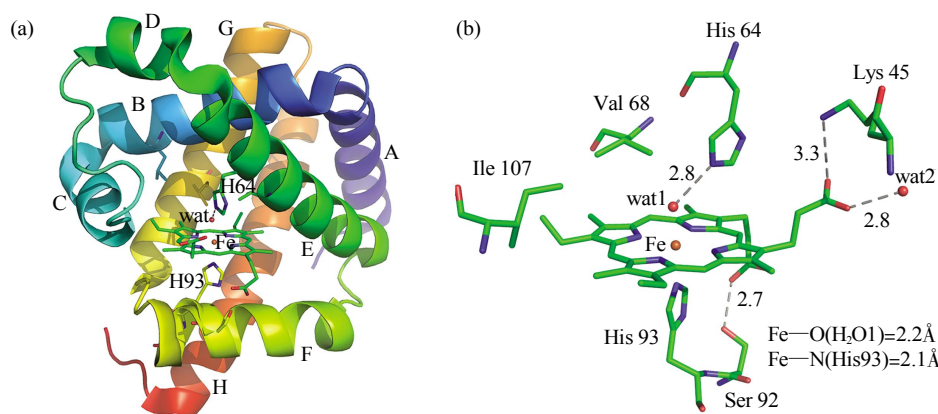


Fig. 1 Structures of wild type horse heart Mb (wt hhMb)

(a) Tertiary structure of Mb (wild type, PDB ID: 1WLK). (b) Heme center structure of Mb (wild type, PDB ID: 1WLK).

我们对野生型 Mb 的结晶条件进行修改、优化, 成功得到了突变型 H93M 的晶体, 并通过 X-射线衍射获得了较好分辨率(1.8Å)的结构数据. 在所获得的突变型 H93M 活性中心结构中(图 2a), 远端腔体的结构与野生型近似, 同样存在 1 个 H₂O 分子与血红素的 Fe 配位结合(Fe—O 键长 2.4Å), 远端 His64 同样与该 H₂O 分子形成氢键(2.6Å). 但是在近端腔体, Mb 近端 His93 被替换为 Met93, 而 Met93 与血红素 Fe 原子距离较远(Fe—S 的距离为 6Å), 无法形成共价键. 在解析结构中, 在近端腔体发现存在 1 个 H₂O 分子处在原 His93 位置(图 2b), 与血红素 Fe 形成配位结合, 但是该 H₂O 分子的占有率仅为 50%, 这表明在突变型 H93M 中, 1/2 的血红素 Fe 仍然处于 6 配位结构, 另 1/2

血红素 Fe 则变为 5 配位结构. 对比突变前后的结构, 可以发现, 血红素平面以及 His64 基本重叠, 结构未发生明显改变, 同时除 Met93 相对 His93 的侧链位置变化较大外, 处于 C~D 螺旋的 Lys45 侧链也发生了明显的偏转, 但仍然与血红素的吡咯 D 环上的丙酸羧基基团形成氢键. 此外, 近端腔体的 Ser92 仍然与血红素吡咯 A 环上的丙酸羧基形成稳定氢键(2.6Å). 相对于野生型 metMb, H93M 中血红素仅通过多个氢键固定在蛋白质内部, 处于不稳定状态, 易发生流失. 这一点在纯化过程中得到了体现, H93M 经过 DEAE 阴离子交换柱分离后, 极易发生血红素流失, 使得蛋白质颜色变淡, 需要补充适量血红素才能恢复深红色.

我们同样获得了突变型 AY 的晶体, 并尝试进

行了 X- 射线衍射收集晶体数据, 但最终所得晶体数据分辨率较低, 质量较差, 因此并未在本文给出

相应结构信息.

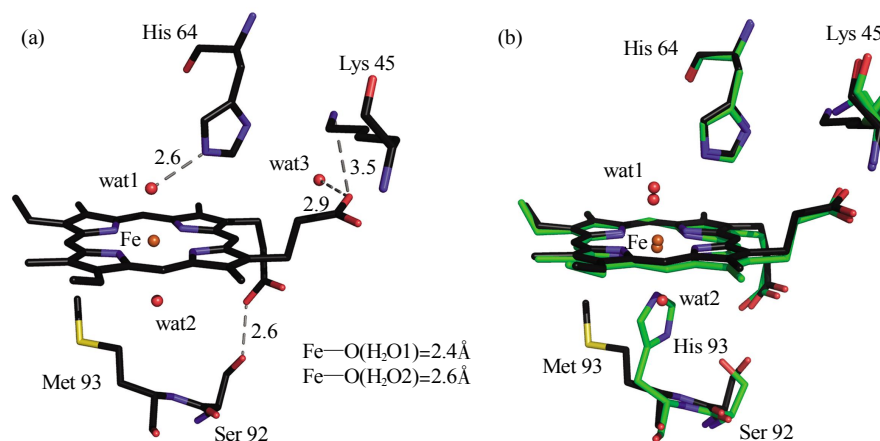


Fig. 2 The final model of the heme active site of the hhMb H93M mutant

(a) The final model of the heme active site of the hhMb H93M mutant (PDB ID: 5Z7E). The occupancy of wat2 is modeled at 50% and the H-bonds are shown as grey dashed lines. (b) Superposition of the final models of the heme active sites of H93M (black) with the wt Mb (green, PDB ID: 1WLA).

2.1.2 突变型 AY- H_2S 的血红素活性中心结构

通过晶体浸泡法, 我们成功制备了 AY- H_2S 衍生物的晶体, 然后通过 X- 射线衍射收集得到了结构数据, 分辨率达到了 $1.9\text{\AA}$. AY- H_2S 的血红素活性中心结构(图 3a)显示, 远端腔体存在 S 原子与血红素中心 Fe 配位结合, 形成 Fe—S 共价键, 键长为 $2.4\text{\AA}$, 同时 S 原子与远端 His64 残基的 N 原子形成氢键($2.9\text{\AA}$); Tyr107 的羟基 O 原子与 S 原子距离较远($5.3\text{\AA}$), 无法形成氢键; Lys45 的侧链发生

偏移, 其侧链氨基 N 原子与血红素的吡咯 D 环上的丙酸羧基 O 原子距离增大至 $4.1\text{\AA}$, 失去氢键作用. 在近端腔体中, 近端 His93 与血红素中心 Fe 仍然以共价键连接, 键长为 $2.1\text{\AA}$; Ser92 与血红素吡咯 A 环上的丙酸羧基形成稳定氢键($2.7\text{\AA}$). 此外, 对比野生型 Mb 的活性中心结构(图 3b), 可以发现两者活性中心附近的氨基酸侧链偏移以及血红素平面的结构变化不明显, 重叠度较高.

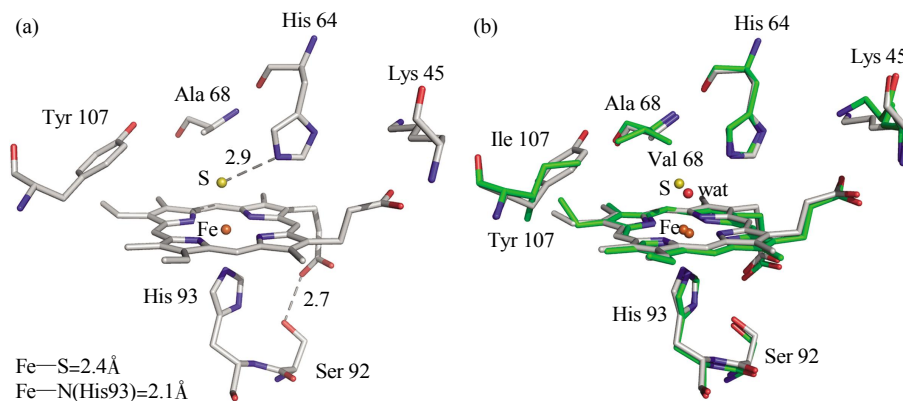


Fig. 3 The final model of the heme active site of the hhMb V68A/I107Y- H_2S adduct

(a) The final model of the heme active site of the hhMb V68A/I107Y H_2S adduct (PDB ID: 5Z7F). The H-bonds are shown as grey dashed lines. (b) Superposition of the final models of the heme active site of the AY (grey) with the wt hhMb (green, PDB ID: 1WLA).

在 *L. pectinata* Hbl-H₂S 结构(图 4a)中, 血红素中心 Fe 共价结合 S 原子, Fe—S 键长为 2.3 Å, Fe—N(近端 His)键长为 2.1 Å, 远端 Gln64 提供氢键与 S 原子结合^[16], 键长为 3.3 Å. 在人体 HbA-H₂S 的血红素活性中心结构(图 4b, c)中, α、β 亚基血红素中心 Fe 均结合 S 原子, Fe—S 键长均为 2.2 Å, Fe—N(近端 His)键长均为 2.3 Å, 远端 His 提供氢键与 S 原子结合^[11], 键长分别为 3.0 Å、3.2 Å.

比较上述结构, 可以认为突变型 AY 晶体经过量 Na₂S 浸泡后, 其血红素中心 Fe 确实与 H₂S 发生

配位结合, 并且结合方式与人体 HbA、*L. pectinata* Hbl 结合 H₂S 的方式相似. 2016 年, Vitvitsky 等^[11]通过 DFT/B3LYP 最优化模型结合相关数据计算, 指出在 metMb 与 Na₂S 的反应中, 如果形成 Fe^{III}-SH₂ 结构, 其 Fe—S 键长应为 2.5 Å, 近端 His93 的 N 原子与 Fe 的 Fe—N 键长应为 1.97 Å; 而形成 Fe^{III}-SH⁻ 结构, 其 Fe—S 键长应为 2.24 Å, 近端 His93 的 N 原子与 Fe 的 Fe—N 键长应为 2.12 Å. 因此, 在 AY-H₂S 结构中, S 原子所代表的配体分子结构可能为—SH⁻ 结构.

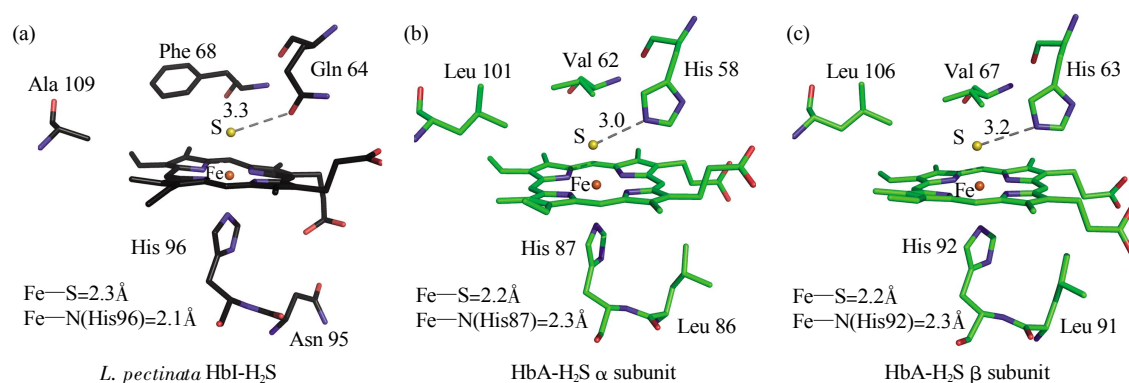


Fig. 4 The final models of the heme active sites of various heme proteins H₂S adduct structures

(a) *L. pectinata* Hbl-H₂S (PDB ID: 1MOH). (b) Human HbA-H₂S (α subunit, PDB ID: 5UCU). (c) Human HbA-H₂S (β subunit, PDB ID: 5UCU). The H-bonding interactions are shown as grey dashed lines.

2.1.3 Mb 的主链结构对比

将所得的突变型 Mb H93M 以及 AY-H₂S 衍生物结构, 与野生型 metMb 晶体结构(PDB ID: 1WLA)进行重叠比较, 利用 CCP4 软件包计算相对于野生型 metMb 主链 C_α 发生的位移, 结果如图 5a 所示. 从图中数据可以看出, 相对于野生型 metMb, 突变型 H93M、AY-H₂S 主链 C_α 的平均位移分别为 0.440、0.430. 重叠对比突变型 Mb H93M、AY-H₂S 与野生型 metMb 的三级结构(图 5b, c), 可以看出三级结构基本重叠. 这些结果结果表明血红素腔体的氨基酸点突变以及 H₂S 的配位结合对 Mb 整体结构影响较小.

2.2 Mb 与 H₂S 反应的紫外-可见光谱研究

2.2.1 野生型 Mb 与 H₂S 反应

从野生型 metMb 与 Na₂S 反应的紫外-可见光谱图(图 6a)中可看出, 当加入过量 Na₂S, 高铁型 Mb 的 Soret 带迅速红移至 427 nm 处, Q 带也随之转变至 544 nm、576 nm, 随着时间的推移, 其 Soret 带又逐渐发生蓝移至 423 nm, 并伴随着吸收

值的降低, 同时在 Q 带范围内, 544 nm 处基本无明显变化, 而 576 nm 处逐渐红移至 578 nm 并伴随着吸收值的升高. 这一现象与 Bostelaar 等^[10]的研究基本相符, 说明在有氧情况下, Na₂S 与野生型 Mb 的反应在 5 min 内形成的是低自旋的 Fe^{III}-HS⁻ 结构, 而当时间延长至 35 min~1 h 后, Fe^{III}便会逐级被还原为 Fe^{II}, 并结合未知的配体分子. 静置 24 h 后, Soret 带继续蓝移至 421 nm, Q 带无明显偏移, 但吸收值均发生了明显的降低, 这说明蛋白质发生明显的降解. 与此同时, 616 nm 处出现明显的吸收峰(sulfheme 的特征吸收峰), 蛋白溶液颜色也呈现出微绿色, 因此可认为此时 Mb 的血红素发生了硫代反应, 生成了 sulfheme 结构.

野生型 Mb 与 H₂O₂、Na₂S 反应后的紫外可见光谱(图 6b)显示, 当野生型 Mb 中加入 H₂O₂ 后, 其 Soret 带逐渐红移至 420 nm, Q 带转变为 546 nm、582 nm, 该过程中 H₂O₂ 将血红素中心 Fe^{II}氧化为 Fe^{IV}. 在刚加入 Na₂S 时, Soret 带偏移不明显, 并立刻在 616 nm 出现较强的吸收峰, 5 min 内 Soret

带迅速蓝移回 408 nm, 616 nm 峰值迅速下降并且峰形变宽, 随后 616 nm 峰值逐渐消失. 这些现象说明当野生型 Mb 血红素中心 Fe 被氧化为 +4 价

时, 无法与 H_2S 配位结合, H_2S 转而修饰血红素卟啉环, 形成 sulfheme 结构, 但是该结构不稳定.

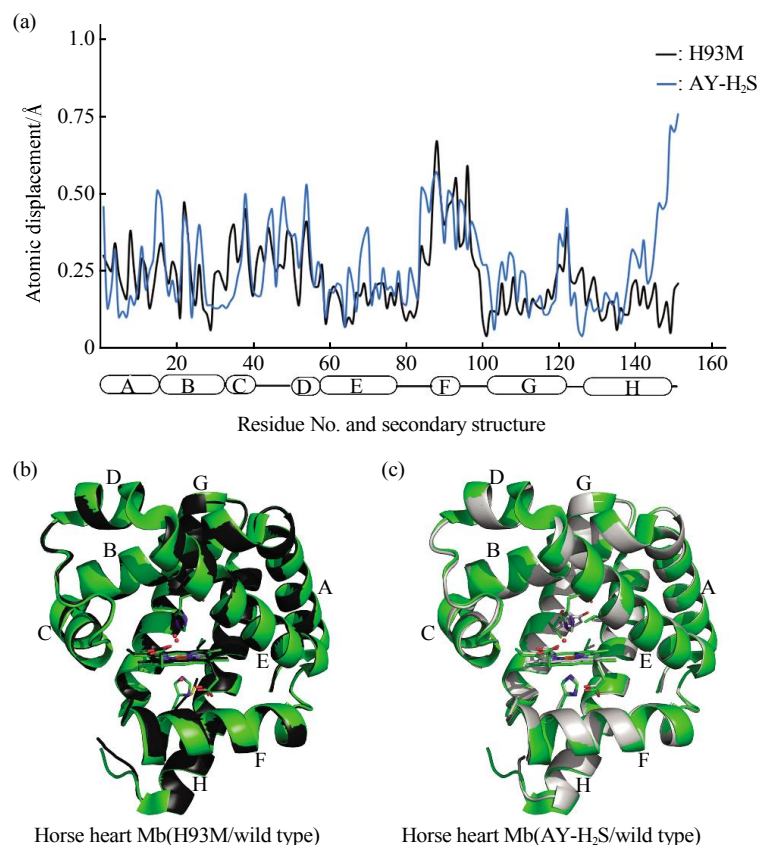


Fig. 5 Plots of $\text{C}\alpha$ displacements (in Å) as a function of residue number in the wt hhMb and mutant structures (a), the superposition of the final models of the tertiary structure of H93M (black) with the wt Mb (green, PDB ID: 1WLA) (b), and the superposition of the final models of the tertiary structure of AY (grey) with the wt Mb (green, PDB ID: 1WLA) (c). The horse heart wild type metMb structure (PDB ID: 1WLA) is used as the reference structure, atomic displacements are shown for the H93M mutant (black line) and AY- H_2S (blue line) structures.

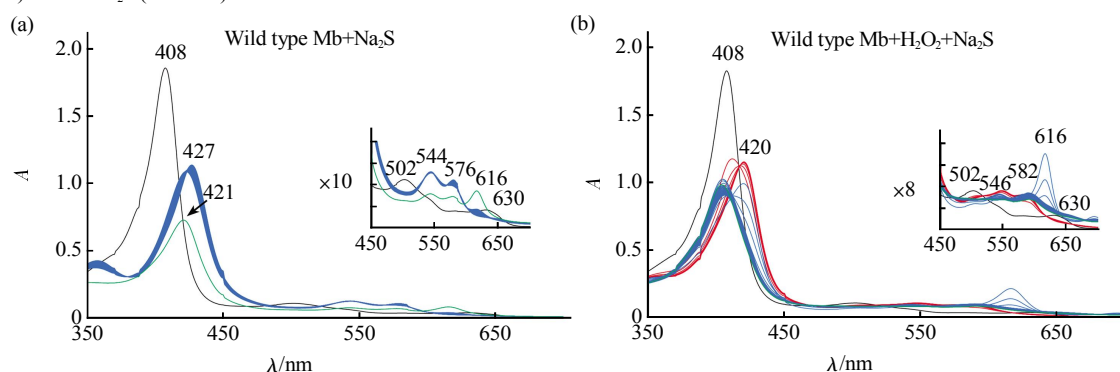


Fig. 6 UV-vis spectra of the reaction of the wt hhMb with Na_2S in 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 7.4) (a) Mb (10 $\mu\text{mol/L}$) with Na_2S (1 mmol/L). (b) Mb (10 $\mu\text{mol/L}$) with H_2O_2 (40 $\mu\text{mol/L}$) and Na_2S (15 $\mu\text{mol/L}$). (black solid line, Mb; red solid line, add H_2O_2 , 0–8 min; blue solid line, add Na_2S , 0–1 h; green solid line, 24 h).

2.2.2 突变型 H93M 与 H_2S 反应

突变型 H93M 与 Na_2S 反应后的紫外 - 可见光

谱(图 7a)显示, 在该突变型 Mb 溶液中加入过量 Na_2S , Soret 带立即蓝移至 393 nm, 并在 Q 带区域

出现 511 nm、536 nm 的微弱肩峰。但在 1 min 后, 其 Soret 带又红移回 404 nm 且峰值下降很多。随着时间推移, Soret 带逐渐红移至 417 nm, Q 带逐渐消失。静置 24 h 后, Soret 带和 Q 带的特征吸收峰均变得不明显, 表明蛋白质降解严重。从 H93M 的晶体结构可知, 其血红素和近端 Met93 无共价键结合, 仅依靠远端配体 H_2O 与 His64 的氢键作用, 以及血红素丙酸根基与相近 Mb 主链残基的氢键作用来稳定血红素的位置。因此可推测, Na_2S 的加入可能破坏了这些氢键, 并且断开了血红素与 H_2O 的配位结合, 使得 Soret 带迅速发生蓝移, 同时血红素变得不稳定发生流失, 促使 Soret 带峰值

迅速下降。随后, H_2S 分子逐渐配位结合到血红素中心 Fe, 并与远端 His64 形成氢键稳定血红素的位置, 引起 Soret 带红移, 峰值下降变缓。

突变型 H93M 与 H_2O_2 、 Na_2S 反应后的紫外可见光谱(图 7b)显示, 当突变型 H93M 溶液中加入 H_2O_2 后, 其 Soret 带逐渐红移至 407 nm, 同时峰值持续下降, 而 Q 带则转变为 544 nm、583 nm, 此时血红素中心 Fe^{III} 逐渐被氧化为 Fe^{IV} 。随后加入 Na_2S , Soret 带逐渐蓝移回 404 nm, Q 带峰形逐渐消失。这些结果说明远端 His93 突变为 Met93 后, 处于 Fe^{IV} 状态的血红素无法与 H_2S 反应形成 sulfheme 结构。

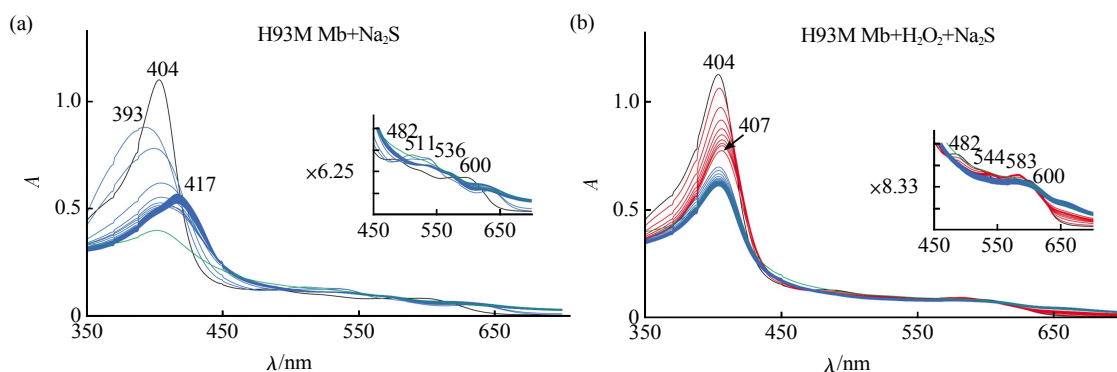


Fig. 7 UV-vis spectra of the reaction of the Mb H93M mutant with Na_2S in 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 7.4)

(a) Mb (10 $\mu\text{mol/L}$) with Na_2S (1 mmol/L). (b) Mb (10 $\mu\text{mol/L}$) with H_2O_2 (40 $\mu\text{mol/L}$) and Na_2S (15 $\mu\text{mol/L}$). (black solid line, Mb; red solid line, add H_2O_2 , 0~8 min; blue solid line, add Na_2S , 0~1 h; green solid line, 24 h).

2.2.3 突变型 AY 与 H_2S 反应

突变型 AY 与 Na_2S 反应的紫外-可见光谱(图 8a)显示, 其光谱变化与野生型的光谱变化十分接近, Soret 带红移至 424 nm, Q 带偏移至 543 nm、576 nm, 之后在 1 h 内基本无明显峰形偏移, 可认为血红素中心 Fe 与 H_2S 发生配位结合形成较为稳定的配位结构。静置 24 h 后, Soret 带蓝移至 421 nm, 且峰值明显下降。而 Q 带峰值变得十分不明显, 这说明血红素中心 Fe 的价态及配位情况可能发生明显变化, 并且蛋白发生明显降解。与此同时在 616 nm 处出现了较弱的 sulfheme 特征吸收峰。从上述结果可以推测 V68A/I107Y 的突变能够稳定血红素中心 Fe 与 H_2S 的配位结构。

突变型 AY 与 H_2O_2 、 Na_2S 反应后的紫外可见光谱(图 8b)显示, 当突变型 AY 与 H_2O_2 反应后, 其 Soret 带略微红移至 409 nm, Q 带转变为 516 nm。

随后加入 Na_2S , 立刻在 609 nm 出现较弱的吸收峰, 可以推测生成 sulfheme 结构, 并且该吸收峰随时间下降缓慢, 静置 1 h 后仍然明显存在。静置 24 h, Mb 基本完全恢复回高铁型, sulfheme 结构消失, 部分蛋白发生降解。这些结果说明 V68A/I107Y 的突变导致 H_2O_2 氧化血红素中心 Fe^{III} 变得困难, 间接影响 sulfheme 形成。 H_2O_2 在氧化 Fe^{III} 过程中, 需要经过 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-H}_2\text{O}$ 到 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ 中间态的转变, 从突变型 AY 晶体结构上看, 推测 I107Y 羟基与配位 H_2O 可能形成较弱的额外氢键, 稳定了 H_2O 的键合, 使得中间态转变变得更加困难, 影响了 Fe^{IV} 的形成。另外, I107Y 位置正好处于吡咯 B/C 环之间, 而 sulfheme 正是 H_2S 修饰在吡咯 C 环 $\text{C}_\beta\text{-C}_\beta$ 双键形成的, 因此在形成 sulfheme 后, 推测 Tyr107 的羟基可能与 S 原子形成氢键, 稳定了 sulfheme 的结构。

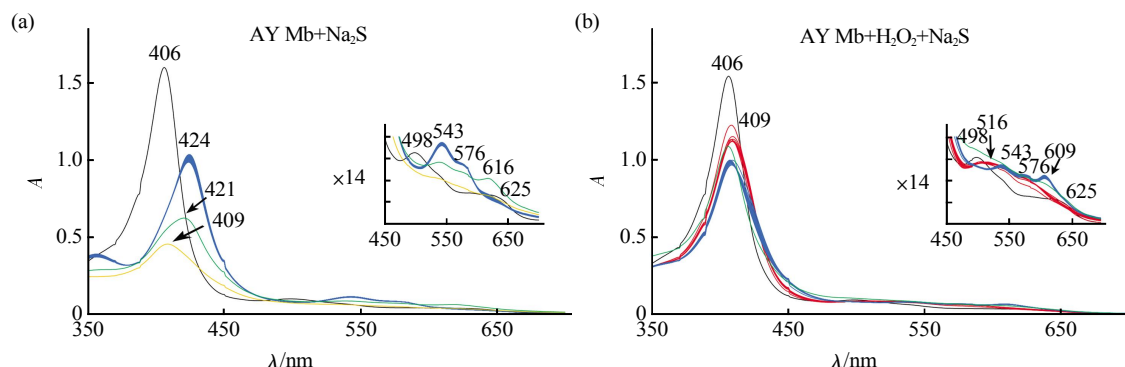


Fig. 8 UV-vis spectra of the reaction of the Mb AY mutant with Na_2S in 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 7.4)

(a) Mb (10 $\mu\text{mol/L}$) with Na_2S (1 mmol/L). (b) Mb (10 $\mu\text{mol/L}$) with H_2O_2 (40 $\mu\text{mol/L}$) and Na_2S (15 $\mu\text{mol/L}$). (black solid line, Mb; red solid line, add H_2O_2 , 0–8 min; blue solid line, add Na_2S , 0–1 h; green solid line, 24 h; yellow solid line, 48 h).

3 总 结

通过对比突变型 H93M、AY 与野生型 Mb 的晶体结构, 发现血红素活性中心附近的氨基酸突变对 Mb 整体结构影响较小, 但是血红素所处环境却发生显著改变. 近端 His93 突变为 Met93 后, Mb 的血红素仅以氢键作用固定在蛋白质内部; 而远端 V68A/I107Y 的突变能够给 H_2O 提供一个较弱的氢键, 同时减弱 H_2O 分子与血红素中心 Fe^{III} 的共价键. 对比突变型 AY 与 H_2S 反应前后以及其他血红素蛋白与 H_2S 结合的晶体结构, 发现 H_2S 分子能够以 $-\text{SH}^-$ 结构结合在 Mb 的血红素中心 Fe^{III} , 且 H_2S 与血红素中心 Fe 的配位结合不会显著改变 Mb 的整体结构以及活性中心环境.

从野生型 Mb 以及突变型 H93M、AY 与 H_2S 反应的紫外 - 可见光谱结果可以看出, Mb 血红素中心 Fe 处于 +3 价态时才能与 H_2S 形成配位结合, 而在被 H_2O_2 氧化为 Fe^{IV} 的状态下, Mb 与 H_2S 反应只能形成 sulfheme 结构. 此外, 近端腔体 H93M、远端腔体 V68A/I107Y 的突变没有影响 Fe^{III} 与 H_2S 的共价键合, 但是却会影响 sulfheme 形成. 在突变型 H93M 与 H_2S 的反应中未观察到 sulfheme 特征峰的出现, 该结果表明近端 His93 对 sulfheme 的形成有着重要意义. 而在突变型 AY 中, 远端腔体引入的氢键会显著减弱 H_2O_2 对血红素中心 Fe^{III} 的氧化, 间接影响 sulfheme 的形成.

结合突变型 Mb 与 H_2S 反应的紫外 - 可见光谱数据以及晶体结构数据, 我们可以看出, 血红素活性中心结构变化对 Mb 与 H_2S 的反应产生显著影

响, 同时 H_2S 与血红素中心 Fe 的结合基本不会显著改变 Mb 的整体结构. 这些结果为研究血红素蛋白质活性中心与 H_2S 反应的控制因素, 以及 H_2S 对血红素蛋白结构和功能的影响提供了重要的实验数据.

参 考 文 献

- [1] Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiological Reviews*, 2012, **92** (2): 791–896
- [2] Wang R. Two's company, three's a crowd: can H_2S be the third endogenous gaseous transmitter. *The FASEB Journal*, 2002, **16**(13): 1792–1798
- [3] Predmore B L, Lefer D J, Gojon G. Hydrogen sulfide in biochemistry and medicine. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2012, **17**(1): 119–140
- [4] Lowicka E, Beltowski J. Hydrogen sulfide (H_2S) - the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacological Reports*, 2007, **59**(1): 4–24
- [5] Polhemus D J, Lefer D J. Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease. *Circulation Research*, 2014, **114**(4): 730–737
- [6] Li Q, Lancaster Jr J R. Chemical foundations of hydrogen sulfide biology. *Nitric Oxide Biology & Chemistry*, 2013, **35**(6): 21–34
- [7] Bieza S A, Boubeta F, Feis A, et al. Reactivity of inorganic sulfide species toward a heme protein model. *Inorganic Chemistry*, 2015, **54**(2): 527–533
- [8] Berzofsky J A, Peisach J, Blumberg W E. Sulfheme proteins. I. optical and magnetic properties of sulfmyoglobin and its derivatives. *The Journal of Biological Chemistry*, 1971, **246**(10): 3367–3377
- [9] Park C M, Nagel R L. Sulfhemoglobinemia. Clinical and molecular aspects. *New England Journal of Medicine*, 1984, **310**(24): 1579–

- 1584
- [10] Bostelaar T, Vitvitsky V, Kumutima J, *et al.* Hydrogen sulfide oxidation by myoglobin. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, **138**(27): 8476–8488
- [11] Vitvitsky V, Yadav P K, An S, *et al.* Structural and mechanistic insights into hemoglobin-catalyzed hydrogen sulfide oxidation and the fate of polysulfide products. *The Journal of Biological Chemistry*, 2017, **292**(13): 5584–5592
- [12] Rios-Gonzalez B B, Roman-Morales E M, Pietri R, *et al.* Hydrogen sulfide activation in heme proteins: the sulfheme scenario. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2014, **133**(2): 78–86
- [13] Fernandez-Alberti S, Bacelo D E, Binning R C, Jr., *et al.* Sulfide-binding hemoglobins: effects of mutations on active-site flexibility. *Biophysical Journal*, 2006, **91**(5): 1698–1709
- [14] Roman-Morales E, Pietri R, Ramos-Santana B, *et al.* Structural determinants for the formation of sulfhemeprotein complexes. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2010, **400**(4): 489–492
- [15] Evans S V, Sishta B P, Mauk A G, *et al.* Three-dimensional structure of cyanomet-sulfinyoglobin C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(11): 4723–4726
- [16] Rizzi M, Wittenberg J B, Coda A, *et al.* Structural bases for sulfide recognition in *Lucina pectinata* hemoglobin I. *Journal of Molecular Biology*, 1996, **258**(1): 1–5

Structure-function Studies of The Interactions of H₂S With Myoglobin Mutants*

WU Yun-Xiang, YI Jun**

(School of Environmental and Biological Engineering at The Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China)

Abstract Endogenous H₂S was recognized recently as a new gaseous signaling molecule which plays beneficial roles in vasodilation and facilitation of long-term potentiation. The interaction of mammalian myoglobin (Mb) with H₂S occurs *via* two distinct pathways: the first is the direct binding of H₂S to the heme-Fe center of the Mb to form the Mb-H₂S adduct, and the second is the covalent modification with H₂S at a porphyrin vinyl group of the Mb heme to form the covalently modified sulfheme. We chose Mb as the prototype heme-containing protein and probed the interactions of different Mb mutants with H₂S by UV-*vis* spectroscopy, and X-ray crystallography. The heme active sites of Mb mutants directly affect the binding of H₂S to the proteins and also the formation of sulfheme derivatives. This provides critical experimental data for elucidating how heme-containing proteins modify the metabolism of endogenous H₂S.

Key words gaseous signaling molecule, H₂S, myoglobin, sulfheme, active site

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0047

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (21271104, 21671103).

**Corresponding author.

Tel: 86-25-84303273, E-mail: yijun@njjust.edu.cn

Received: February 1, 2018 Accepted: April 17, 2018