

L78 部分氨基酸残基对 SERCA1a 钙转运功能的影响 *

王国丽^{1)**} DAIHO Takashi²⁾ YAMASAKI Kazuo²⁾ DANKO Stefania²⁾

王彪¹⁾ 宿文辉¹⁾ SUZUKI Hiroshi^{2)**}

⁽¹⁾ 中国医科大学生物化学与分子生物学教研室, 沈阳 110001;

⁽²⁾ Department of Biochemistry, Asahikawa Medical University, Asahikawa 078-8501, Japan)

摘要 跨肌浆网膜的钙离子 ATP 酶 SERCA1a 可在水解 ATP 的同时逆浓度梯度从胞浆转运钙离子入肌浆网, 引发收缩的骨骼肌细胞舒张. 目前对 SERCA1a 结构与功能的研究, 要领先于对其他 P 型离子转运 ATP 酶的研究. 为了解 SERCA1a 跨膜螺旋 M7 与 M8 膜内侧连接部 Linker78(L78)的功能, 我们评估了 L78 部分氨基酸残基突变对 SERCA1a 反应循环的影响, 发现: 除 G864A 之外的所有突变体均可不同程度地降低钙离子转运速率; G862 或 P863 氨基酸残基的突变导致 SERCA1a 的 ATP 酶活性显著降低或丧失, 并引起由 ATP 或无机磷酸 Pi 生成的磷酸化酶中间体 EP 量显著减少; A893 被 P 取代对 SERCA1a 的影响与 G862、P863 突变相似; 与野生型 SERCA1a 相比, G864A 与 FMQ873-875 单突变体 ATP 酶活性及 EP 生成量无明显差别. 上述结果表明, M7、M8 膜内侧连接部 L78 不仅与跨膜区钙离子转运过程密切相关, 而且 L78 在 GPG862-864 处及 A893 附近的正确转折对胞浆结构域 P 的磷酸化也具有关键的远距离调控作用, 提示 L78 的结构及柔度对 SERCA1a 构象正常的周期性变化至关重要.

关键词 P 型 ATP 酶, 钙离子 ATP 酶, SERCA, 定点诱变, 反应循环

学科分类号 Q5, Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00524

SERCA1a^[1]是肌浆网 - 内质网钙离子转运 ATP 酶 (sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} transporting ATPase, SERCA)的成人骨骼肌型, 利用自身水解 ATP 释放的能量, 将骨骼肌细胞胞浆内的钙离子逆浓度梯度主动转运入肌浆网, 保证肌肉收缩舒张的正常进行. SERCA 的其他亚型分布在不同组织细胞的内质网膜上, 维持膜两侧的钙离子浓度梯度, 参与调控兴奋、收缩、分化、分泌、凋亡、受精等几乎所有的细胞活动^[2]. 在包括 SERCA 蛋白在内的所有 P 型离子转运 ATP 酶中, 对 SERCA1a 的研究最为深入. 研究 SERCA1a 获得的结构与功能信息, 对 P 型 ATP 酶的研究具有重要的指导意义^[3-4].

SERCA1a 由 998 个氨基酸残基构成, 空间结构可分为胞浆部分、跨膜区螺旋和膜内侧连接部 (图 1a). 跨膜区由 10 个 α 螺旋组成, 螺旋 M4、M5、M6 和 M8 上的氨基酸残基构成 2 个钙离子结合位点. 根据该位点与钙离子亲和力的大小可将

SERCA1a 的状态分为 E1 和 E2. 胞浆部分形成三个结构域 A、P、N. 结构域 N (nucleotide binding domain) 可结合 ATP 或 ADP; 结构域 P (phosphorylation domain) 的 D351 侧链羧基可被 ATP 或无机磷酸 (H_3PO_4 , Pi) 磷酸化, 生成磷酸化酶中间产物 EP; 而结构域 A (actuator domain) 则在跨膜螺旋结合钙离子后, 与结构域 N、P 相互作用, 并在结构域 N 释放 ADP 后驱动钙离子向肌浆网腔释放^[4-5]. 在 SERCA1a 的反应循环中 (图 1b), 首先钙离子从胞浆侧进入钙离子结合位点并与之结合 ($\text{E2} \rightarrow \text{E1Ca}_2$, 步骤 (1)~(2)), 随后结构域 P 的 D351 被 ATP 磷酸化形成 E1PCa_2 (步骤 (3)), E1PCa_2

* 日本文部省科学研究辅助金资助项目.

** 通讯联系人.

王国丽. Tel: 024-23256666-5477, E-mail: glwang@mail.cmu.edu.cn

SUZUKI Hiroshi. Tel: 81-166-68-2350

E-mail: hisuzuki@asahikawa-med.ac.jp

收稿日期: 2014-02-18, 接受日期: 2014-04-25

对 ADP 敏感, 可与 ADP 反应重新生成 ATP, E1PCa₂ 的构象会发生变化, 使其钙离子结合位点与钙离子的亲和力下降, 钙离子被释放进入内质网腔(E1PCa₂→E2P, 步骤(4)), E2P 对 ADP 不敏感, 不能与 ADP 反应生成 ATP, 最后 E2P 去磷酸化, 结构恢复到 E2 状态(步骤(5))^[5-6].

Toyoshima 等^[7-11]和 Nissen 等^[12]研究小组通过解析一系列高分辨率晶体结构, 证明了在 SERCA1a 反应循环过程中存在 SERCA1a 构象的周期性变化(图 1b). 在已解析的 SERCA1a 晶体结构中, 跨膜螺旋 M7 与 M8 的膜内侧连接部 L78 在肌浆网膜内侧形成无规卷曲. 由于 L78 包含 M857 至 P894 的 38 个氨基酸残基, 无规卷曲的肽段较长, 晶体结构无法准确反映 L78 的动态变化及 L78 与

其他结构的相互作用, 所以难以通过已有的晶体结构准确预测 L78 的功能. 因此我们通过 cDNA 定点诱变和真核细胞表达, 获得 L78 部分氨基酸残基单突变体的 SERCA1a 蛋白后, 检测突变蛋白的 ATP 水解能力、钙离子转运和 EP 生成量, 并与 SERCA1a 野生型蛋白进行比较, 从而证实 L78 与 SERCA1a 的钙离子转运功能密切相关. 同时发现部分氨基酸残基可影响 L78 的适当转折(turn)和柔性(flexibility), 对胞浆结构域 P 的磷酸化也产生至关重要的影响.

1 材料与方法

1.1 SERCA1a 突变体的构建及蛋白质表达

SERCA1a cDNA 和 pMT₂ 质粒^[13]分别获赠于 D.H.MacLennan 教授(Banting and Best Departments of Medical Research, University of Toronto)与 R.J. Kaufman 教授 (Genetics Institute Inc. Cambridge, MA). 依据 QuikChange^[14]法原理, 以野生型 pMT₂-SERCA1a 质粒 DNA 为初始模板, 使用包含突变密码子的互补引物(Sigma 公司), 利用 KOD plus DNA polymerase(Toyobo 公司)催化 PCR 体系内的 pMT₂-SERCA1a 突变体以几何级数扩增, 而终产物中微量的野生型 pMT₂-SERCA1a 质粒则通过 *Dpn* I (Promega 公司)酶切被除去. pMT₂-SERCA1a 突变体克隆的 *Sph* I -*Sal* I 片段通过双酶切连接回野生型 pMT₂-SERCA1a 载体(*Sph* I、*Sal* I、T4 DNA ligase, Takara 公司). 应用 DYEnamic ET terminator cycle sequencing kit (Amersham Bioscience 公司)及 ABI Prism 310 测序仪进行测序鉴定. 质粒提纯试剂盒从 Qiagen 公司购入.

细胞培养及转染试剂为 Invitrogen 公司产品. COS-1 细胞(ATCC)在 10 cm 培养皿(Corning 公司)中培养. 培养基为含 10% FBS 的 DMEM, 无抗生素. 培养箱设置 100%湿度、5% CO₂, 培养温度为 37℃. 细胞融合度约 70%时进行转染. 转染过程中使用无血清 DMEM. 每皿分别加入 pMT₂ 空质粒、pMT₂-SERCA1a 野生型或突变质粒 DNA 8 μg、lipofactamine 30 μl、plus reagent 20 μl, 孵育 5 h 后更换含血清的 DMEM, 继续培养 2~3 天.

1.2 微粒体制备及蛋白质浓度测定

微粒体制备^[15]时, 先将贴壁生长的 COS-1 细胞用 5 ml PBS 洗 2 次, 收集至 2 ml 含 5 mmol/L EDTA 的 PBS 缓冲液中. 加 5 ml PBS, 离心,

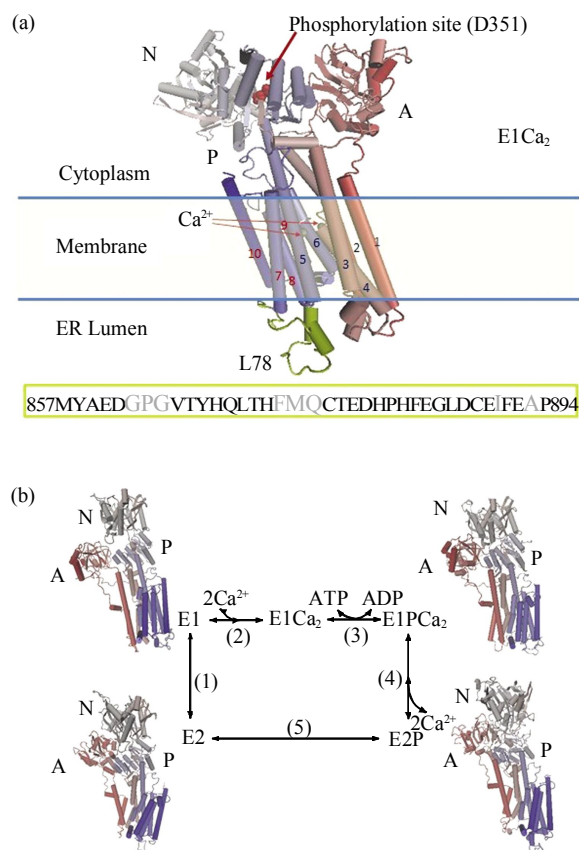


Fig. 1 The structure model of Ca²⁺-ATPase SERCA1a(a) and the SERCA1a conformational changes accompanying its reaction cycle(b)

The coordinates for structures were obtained from RCSB Protein Data Bank. The structural models were reproduced by VMD. PDB IDs are 1SU4 (E1Ca₂ analog), 3W5B (E1 analog), 2ZBD (E1PCa₂ analog), 3B9B (E2P analog), and 1IWO (E2 analog). In the yellow frame of panel (a), the amino acid sequence of L78 was given in one-letter abbreviations. The enlarged grey-colored amino acid residues were mutated to alanine, proline, or glycine independently for functional analysis. ER: endoplasmic reticulum.

弃上清. 用 2 ml 低渗液(10 mmol/L Tris-HCl、0.5 mmol/L MgCl_2 , pH 7.5)混悬, 静置 10 min 后加入蛋白酶抑制剂 aprotinin 200 U 和 100 mmol/L PMSF 20 μl , 使用 Dounce 玻璃匀浆器匀浆 40 次. 加入 2 ml 溶液 A(蔗糖 0.5 mol/L、 β 巯基乙醇 6 mmol/L、 CaCl_2 40 $\mu\text{mol/L}$ 、KCl 300 mmol/L、Tris-HCl 10 mmol/L, pH 7.5), 继续匀浆 20 次, 10 000 g 离心 20 min(Himac CR 21G, Hitachi 公司). 将上清与 0.9 ml 的 2.5 mol/L KCl 混匀, 150 000 g 离心 10 min(Himac CS 100FX, Hitachi 公司). 微粒体沉淀用 100 μl 溶液 B 混悬, -80°C 保存. 溶液 B 成分为蔗糖 0.25 mol/L、 β 巯基乙醇 3 mmol/L、 CaCl_2 20 $\mu\text{mol/L}$ 、KCl 150 mmol/L、Tris-HCl 10 mmol/L, pH 7.5. 离心在 4°C 进行, 其他步骤均在低温实验室内冰上完成.

应用 Lowry 法^[16]测定微粒体蛋白质浓度, BSA 为标准品, 每样本或标准品设 4 个平行孔, 孔间变异系数低于 2%. 微粒体蛋白中的 SERCA1a 由双抗体夹心 ELISA 法^[17]定量, 标准品为兔骨骼肌制备的肌浆网小泡^[18-19]. 固相抗体为羊抗兔 SERCA1a IgG, 一抗为鼠 SERCA1a 单克隆抗体(MA3-911, Affinity Bioreagents 公司), 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体 IgG(Amersham-pharmasia 公司), 发色底物为 Life Technologies 公司的 TMB. 加入 0.2 mol/L 硫酸终止显色反应. 每个样本或每个浓度标准品均设 5 个平行孔. 测吸光度使用 BIO RAD MODEL 550 酶标仪. Lowry 法测定每培养皿细胞制备的微粒体蛋白量约为 0.1 mg, 而 ELISA 结果显示微粒体蛋白中野生型 SERCA1a 的含量约为 2%, 即每毫克微粒体蛋白中含 20 μg SERCA1a. 部分突变体的表达量低于野生型 SERCA1a, 如 Q875G 的表达量仅为野生型 SERCA1a 的 50%.

1.3 SERCA 反应循环的检测^[6, 20]

1.3.1 SERCA1a 蛋白特异的 Ca^{2+} -ATP 酶活性测定

SERCA1a 蛋白的 ATP 水解速率检测在 25°C 进行. 反应体系为 50 μl , 含 0.01 g/L 微粒体蛋白、50 mmol/L MOPS/Tris (pH 7.0)、100 mmol/L KCl、7 mmol/L MgCl_2 、0.55 mmol/L CaCl_2 、0.5 mmol/L EGTA、1 $\mu\text{mol/L}$ A23187, 加入 0.1 mmol/L $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 开始反应. 反应时间一般为 5、10、15 或 20 min, 加入等体积终止液(10% TCA, 1 mmol/L Na_3PO_4)混合, 再加入 450 μl 的异丁醇、苯、钼酸铵萃取游离磷酸, 取 200 μl 进行 β 闪烁计数. 其

时间放射性曲线为直线, 斜率为单位时间每毫克 SERCA1a 蛋白水解的 ATP 量. 上述 ATP 酶活性需减去非钙离子依赖的 ATP 酶活性, 方为 Ca^{2+} 依赖的 ATP 酶活性. 非钙离子依赖的 ATP 酶活性检测体系含 5 mmol/L EGTA, 但不加入 CaCl_2 , 其余同上. 计算过表达的外源 SERCA1a 蛋白特异的 Ca^{2+} -ATP 酶活性, 还需要减去由 pMT₂ 空质粒转染细胞制备的对照微粒体蛋白 Ca^{2+} -ATP 酶活性本底. 该本底为 COS-1 细胞内源蛋白 Ca^{2+} 依赖的 ATP 酶活性, 低于外源野生型 SERCA1a 蛋白 Ca^{2+} -ATP 酶活性的 0.5%.

1.3.2 SERCA1a 蛋白钙离子转运功能评估

SERCA1a 野生型或突变型蛋白转运钙离子的功能通过微粒体的钙离子摄取实验评估. 反应体系为 0.01 g/L 微粒体蛋白、20 mmol/L MOPS/NaOH (pH 7.0)、100 mmol/L KCl、7 mmol/L MgCl_2 、5 mmol/L oxalate、0.1 mmol/L $^{45}\text{CaCl}_2$ 、 ± 0.5 mmol/L 毒胡萝卜素(Thapsigargin)、5 mmol/L ATP, 反应在 37°C 进行. 先在多连样品滤过装置上(1225 sampling manifold, Millipore)摆好孔径 0.22 μm 圆片滤膜, 再将 ATP 加入反应管内开始反应, 常规于 2、4、6 和 8 min 时各取出 100 μl 反应液加到滤膜上过滤. 截留了微粒体的滤膜通过过滤 5 ml 的洗涤液(20 mmol/L MOPS/NaOH (pH 7.0)、100 mmol/L KCl、7 mmol/L MgCl_2 、2 mmol/L EGTA)清洗 3 次, 将干燥后的滤膜进行 β 闪烁计数. 结合时间放射性曲线以及 20 nmol $^{45}\text{CaCl}_2$ 的 cpm (count per minute)计算出各反应体系中微粒体每分钟摄取钙离子的摩尔数, 相同样品加減 Thapsigargin 两反应体系的差值即为该 SERCA 蛋白的钙离子转运速率. 外源 SERCA1a 蛋白的钙离子转运速率, 还需要减去对照微粒体蛋白的钙离子转运速率.

1.3.3 SERCA1a 蛋白的磷酸化中间体 EP 定量分析

由 ATP 生成的总 EP 量在 0°C 测定. 反应体积 50 μl , 含 50 mg/L 微粒体蛋白、50 mmol/L MOPS/Tris (pH 7.0)、0.1 mol/L KCl、7 mmol/L MgCl_2 、0.55 mmol/L CaCl_2 、0.5 mmol/L EGTA、1 $\mu\text{mol/L}$ A23187, 加入 0.01 mmol/L $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 开始反应, 反应时间 10 s (此条件下 EP 生成反应在 1 s 内达到平衡). 与等体积 15% TCA 及 0.3 mol/L Na_3PO_4 混合终止反应. 在 0°C 、10 000 g 离心 4 min, 通过 5% 浓度胶 SDS-PAGE 分离沉淀中的蛋白质, 切胶、固定、干燥后, 与标准品点样滤纸同时进行磷

屏放射自显影定量分析(BAS 2000, Fuji). 对照微粒体蛋白的 EP 生成量做为本底被减去, 该本底低于外源 SERCA1a 野生型蛋白 EP 生成量的 5%.

由 $\text{Pi}(\text{H}_3\text{PO}_4)$ 生成的 E2P 定量在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 反应 10 min (此条件下 E2P 生成反应在 1 min 内达到平衡). 体系中不含 CaCl_2 、A23187、ATP, EGTA 浓度为 5 mmol/L, 加入 0.1 mmol/L ^{32}Pi 开始反应. 其余同上.

1.4 其他

放射性同位素标记的试剂由 PerkinELmer 公司提供. 其他试剂购于 Sigma 公司及日本和光公司. 一般溶液为自制.

蛋白质结构分析及作图应用 Swiss-Pdb Viewer v4.0.1、VMD 1.9.1. 采集的数据应用 Microsoft Office Excel 2003 处理. 结果的差异显著性比较采用 t 检验, 统计软件为 SPSS12.0.

2 结 果

野生型 SERCA1a 蛋白的 Ca^{2+} -ATP 酶活性、钙离子转运速率和 EP 生成量参见表 1. 实验中对不同批次的(3 批次以上)野生型 SERCA1a 蛋白进行多次($n\geq 5$)测定. 而对 SERCA1a 突变体的检测结

Table 1 Results of wild type SERCA1a determined in four types of assays ($n\geq 5$)

	Average	STD
Ca^{2+} ATPase activity/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1})$	3.36	0.30
Ca^{2+} uptake rate/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1})$	5.14	1.02
EP formed from ATP/ $(\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1})$	3.31	0.14
E2P formed from Pi/ $(\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1})$	6.98	0.92

果分析过程中, 以野生型 SERCA1a 蛋白结果为标准, 计算相对测定值(图 2~4).

2.1 Ca^{2+} -ATP 酶活性的测定

SERCA1a 水解 ATP 的速率(图 2)可从总体上反映 SERCA1a 反应循环的进行情况, 直接受 $\text{E1Ca}_2\leftrightarrow\text{E1P Ca}_2$ 可逆反应(步骤(3))、 $\text{E1P Ca}_2\rightarrow\text{E2P}$ 变构(步骤(4))和 E2P 水解(步骤(5))各步反应的影响. GPG862-864 中的 G862 被 P 取代, 导致 Ca^{2+} -ATP 酶活性丧失. 与野生型 SERCA1a 蛋白酶活性相比, G862A 突变体的酶活性仅为野生型 SERCA1a 蛋白的 11%. P863 的 A 和 G 突变体 ATP 酶活性降至野生型 SERCA1a 的 20%~30%. 而紧邻 G862 和 P863 的 G864 突变体则达到了与野生型 SERCA1a 相似的 ATP 水解速率.

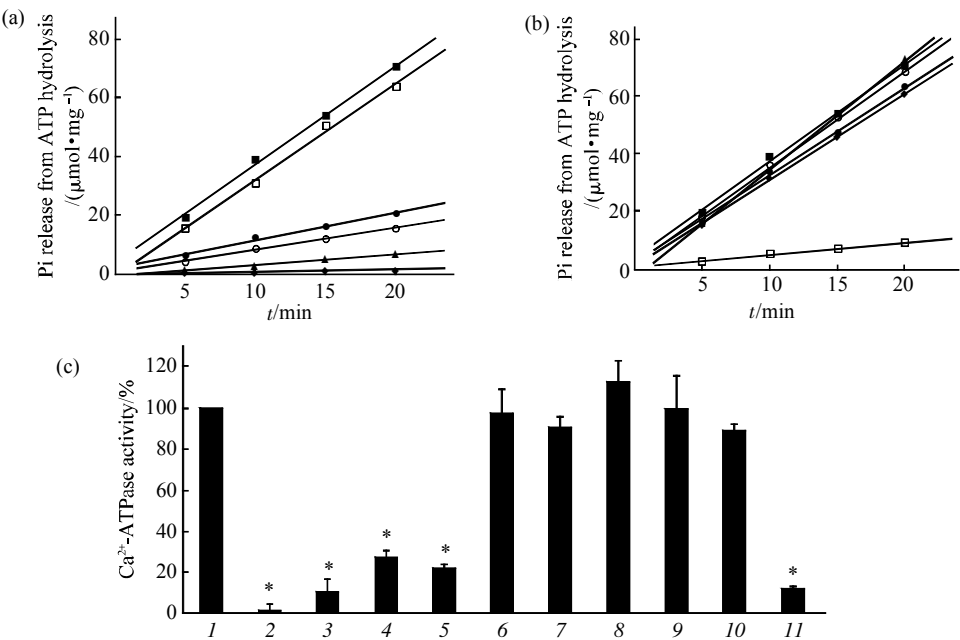


Fig. 2 Time courses of ATP hydrolysis (a, b) and Ca^{2+} -ATPase activities (c) determined for SERCA1a wild type and mutants

In panel (a, b), each set of data were selected for the reason that their Ca^{2+} -ATPase activities are close to their corresponding averages. In panel (c), Ca^{2+} -ATPase activities were shown in the averages of more than 6 times of measurements. $*P<0.01$, compared with the wild type. (a) ■—■: Wild type; ◆—◆: G862P; ▲—▲: G862A; ●—●: P863G; ○—○: P863A; □—□: G864A. (b) ■—■: Wild type; ●—●: F873G; ▲—▲: M874G; ○—○: Q875G; ◆—◆: I890A; □—□: A893P. (c) 1: Wild type; 2: G862P; 3: G862A; 4: P863G; 5: P863A; 6: G864A; 7: F873G; 8: M874G; 9: Q875G; 10: I890A; 11: A893P.

FMQ873-875 的 G 取代和 I890 的 A 取代均对 SERCA1a 的 Ca^{2+} -ATP 酶活性无明显影响, 而 SERCA1a 的 A893P 突变体 ATP 水解速率则减低至野生型的 13% 左右.

2.2 钙离子转运功能的评估

如 SERCA1a 跨肌浆网膜主动转运钙离子的反应循环(图 1b)所述, 在评估钙离子转运的实验体系中, 微粒体膜上的 SERCA1a 向微粒体内摄取钙离子, 也需要与 ATP 水解过程偶联. 因此 Ca^{2+} -ATP 酶活性极低的突变体 SERCA1a 均有钙离子转运功能障碍, 如 G862A、P863A(图 3). 我们未对其他 ATP 酶活性显著下降的 SERCA1a 突变体进行钙离子转运功能检测. 在 Ca^{2+} -ATP 酶活性无明显改变的 SERCA1a 突变体中, 除突变体 G864A 钙离子转运速率与野生型 SERCA1a 相比无显著变化外, FMQ873-875 的单突变体和 I890A 均引起不同程度的 SERCA1a 钙离子转运速率下降(图 3).

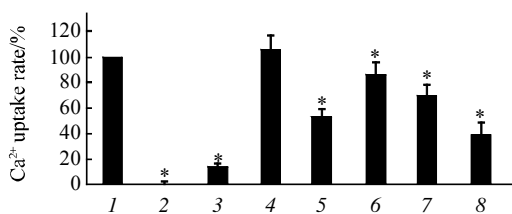


Fig. 3 Ca^{2+} uptake rates of SERCA1a wild type and mutants across the microsomal membrane

* $P < 0.01$, compared with the wild type. $n > 6$. 1: Wild type; 2: G862A; 3: P863A; 4: G864A; 5: F873G; 6: M874G; 7: Q875G; 8: I890A.

2.3 EP 定量结果

为进一步分析 ATP 酶活性和钙离子转运功能改变的主要原因, 我们采用放射自显影方法分别测定了各 SERCA1a 突变体磷酸化稳定状态下的 EP 总量. 该 EP 总量是反应达到平衡后, 反应循环中 E1P 到 E2P 各磷酸化酶中间体的总和. 结果表明, SERCA1a 各突变体 EP 总量的变化与它们 Ca^{2+} -ATP 酶活性变化趋势基本一致(图 4 中黑色柱), 即 G⁸⁶²P⁸⁶³G 和 A893 突变可降低 EP 总量($P < 0.01$), 而 G864 和 F⁸⁷³M⁸⁷⁴Q 单突变体的 EP 总量则无明显变化. 提示 L78 氨基酸残基突变引起 Ca^{2+} -ATP 酶活性下降, 可能主要由于所生成的磷酸化中间体 EP 总量减少, 而不是由于反应步骤(5)的 EP 水解过程障碍所造成.

通过对由 Pi 生成的 E2P 进行定量分析(图 4 中

白色柱), 即独立评估反应循环中步骤(5)的逆反应, 可以明确 SERCA1a 突变体的 ATP 磷酸化中间体 EP 总量减少, 是否仅由结构域 N 结合 ATP 能力下降所致的能够接近 D351 羧基的 ATP γ 磷酸基团减少而引起, 或者主要是磷酸化位点构象异常所致 Pi 无法攻击 D351 羧基形成磷酸酯键的结果. 结果表明, G862 突变体蓄积的 E2P 量低于野生型 SERCA1a 蛋白的 5% ($P < 0.01$), 说明 G862 突变导致磷酸化位点构象异常, 阻碍了 D351 磷酸化. P863G、P863A 和 A893P 突变也导致了 E2P 蓄积量不同程度下降($P < 0.01$), 与 EP 总量的改变基本一致. 而 G864A、F873G 和 M874G 突变体的 E2P 量与野生型 SERCA1a 相比较, 无明显减少. 比较相同突变体的总 EP 和 E2P 相对生成量(图 4, solid bars to empty bars), 结果发现除生成量极低的 G862 之外, 其余 SERCA1a 单突变体的 E2P 蓄积百分比均高于其自身 EP 总量的百分比. 以上结果提示这些突变也可能轻度降低结构域 N 结合 ATP 的能力, 或者引起结构域 N 接近结构域 P 的相对运动受阻, 致使 ATP 的 γ 磷酸难以到达 D351 羧基攻击的有效距离之内.

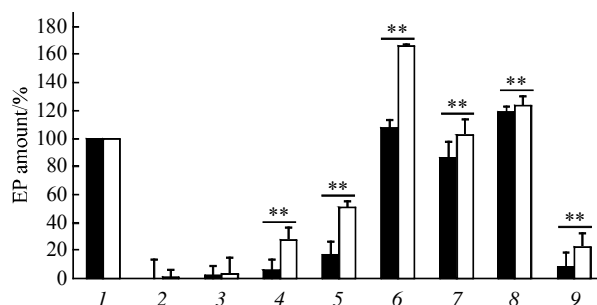


Fig. 4 Amount of total EP formed from ATP and E2P formed from Pi determined for SERCA1a wild type and mutants

** $P < 0.05$, compared EP amount formed from ATP (solid bars) with E2P amount formed from Pi (empty bars). $n > 5$. 1: Wild type; 2: G862P; 3: G862A; 4: P863G; 5: P863A; 6: G864A; 7: F873G; 8: M874G; 9: A893P. ■: EP formed from ATP; □: E2P formed from Pi.

3 讨 论

由于跨膜螺旋 M7-M10 在 SERCA 蛋白和其他 P 型 ATP 酶中结构保守性低等原因, 对 SERCA1a M7~M10 螺旋及其连接部的功能研究一直未能得到足够重视. 尽管 M8 上的 E908 参与钙离子位点 II 的构成, 但是 Toyoshima 等^[10-11]利用晶体结构详

尽地阐明钙离子结合位点胞浆侧入口和导向内质网的流出通道如何有序地开放关闭时, 亦只关注胞浆结构域和 M1~M6 螺旋的构象及相互作用的动态变化情况. 而对 M7~M10 连接部的功能研究, 仅有本实验小组在 2001 年详细报道过 L78 的 C876 与 C888 之间形成二硫键, C876 和 C888 的单突变体和双突变体几乎完全丧失钙离子转运能力, 但保留大部分的 ATP 酶活性, 即该二硫键的破坏导致钙离子转运与 ATP 水解过程的解耦联^[20].

为了解 L78 对 SERCA1a 结构与功能的影响, 我们对近 M7 末端处的 GPG862~864、M8 末端与 C888 之间的 A893 和 I890、C876 上游的 FMQ873~875(图 5)进行了突变研究. 结果(图 2~4)表明, 除 G864A 外的单突变体均引起钙离子转运速率不同程度的下降, 证实 L78 对钙离子转运具有重要意义. G864A 突变只在构象自由度最大的 G 残基侧链增加一个甲基, 对具有一定柔性的 L78 结构与功能未造成显著影响是合理的. L78 作为 SERCA1a 内质网膜内侧最长的一段无规卷曲, 可能通过与其他膜内侧连接部或跨膜螺旋末端相互作用而参与或影响钙离子释放. 此外, M8 的 E908 侧链氧原子可与钙离子结合位点 II 的钙离子配位(图 5), 因此 L78 的氨基酸残基突变引起的构象异常易于传递到钙离子结合位点, 降低钙离子亲和力, 甚至可造成钙离子向胞浆侧返流^[1, 4, 21].

虽然 FMQ873-875 与 I890 变异对 SERCA1a 的 ATP 水解能力和 EP 生成量无明显影响, 却可在不同程度上降低钙离子转运速率, 此现象与 C876-C888 二硫键缺失所产生的影响相似. 提示该二硫键附近的结构与 SERCA1a 结合或释放钙离子的能力相关, 但其侧链基团缺失并不会影响与其相距 50Å 的胞浆结构域 P 的磷酸化和去磷酸化. 突变研究的结果支持一些晶体结构分析结果, 如在 E2P 中, FMQ873~875 与 I890 均参与 L78 局部 3_{10} 螺旋形成, 侧链变短或删除不妨碍二级结构中主链 N—H 和 C=O(i+3)间的氢键形成(图 5, 右). 与之相反, G862、P863 和 A893 残基突变时, SERCA1a 的 ATP 水解功能丧失或严重受损, 不仅难以被 ATP 磷酸化生成 EP, 甚至从 Pi 生成 E2P 也显著减少, 提示 GP⁸⁶³G 和 A893 对胞浆 P 结构域的 D351 磷酸化具有重要意义. 这 3 个氨基酸残基在接近 M7 和 M8 处参与形成 GP⁸⁶³G 和 A⁸⁹³PE 转折(图 5, 左), 分别被 G、A 或 P 取代时, 必定改变 L78 的柔性及热稳定性, 引起 L78 构象和动力学改变. 这种变化可能通过 M7 和 M8 传递至 SERCA1a 的其他跨膜螺旋和胞浆结构域处, 从而影响 SERCA1a 反应循环.

胞浆磷酸化位点和膜内钙离子结合位点的构象适时适度动态变化, 是保证 SERCA1a 的 EP 生成、水解和钙离子结合、释放顺利进行的结构基础^[4-5]. 一级结构的连接和空间构象的精密设计, 使胞浆结构域与跨膜螺旋之间能够及时传递信息, 互相配合执行其功能. 结构域 A 由 M1 的 N 端肽段和 L23 (跨膜螺旋 M2 和 M3 的胞浆连接部)构成, M4 和 M5 连接部 L45 则形成结构域 N 和 P. 在 E1^[10]和 E1Ca₂^[7]晶体结构中, 三个胞浆结构域处于开放状态, 最长的跨膜螺旋 M5 伸直, 胞浆端深入结构域 P(图 1). 而 E1Ca₂ 之后的反应(图 1b)需要结构域 N、P、A 的大幅度倾斜、旋转、楔入等动作, M5 弯折, 跨膜螺旋重排, 胞浆结构域接近, 通过复杂的非共价相互作用形成正确的磷酸化位点^[9]. 与此同时, 在交通枢纽部位形成的 Y122 决定簇(图 5, 右)则通过疏水作用, 在 SERCA1a 胞浆结构域活动与跨膜螺旋摆位过程中发挥极其重要的作用^[6, 22-23]. Y122 疏水性决定簇由 8 个氨基酸残基组成, Y122 和 L119 位于结构域 A 和 M2 连接部, I232 和 I235 位于结构域 A 和 M3 连接部; I179 和 L180 位于 TGE¹⁸³S 环上游, 而 V705 处于 DGVND⁷⁰⁷ 环中间位置; V726 则临近 M5 胞浆端(参见 MacLennan 等综

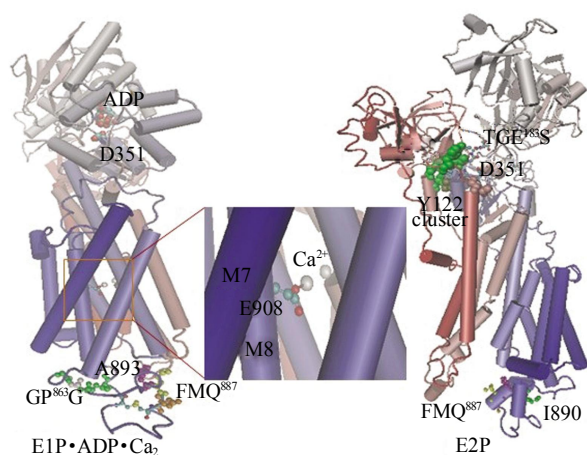


Fig. 5 Conformations of the E1P•ADP•Ca₂ analog and the E2P analog emphasized for L78, the Ca²⁺ sites, D351 (the phosphorylation site), and the Y122 hydrophobic cluster

PDB IDs for analogs are 2ZBD (E1P•ADP•Ca₂) and 3B9B (E2P) respectively. All representations here were made by VMD.

述的图 2^[1]). TGE¹⁸³S 和 D⁷⁰³GVND 环直接与磷酸化位点内 H₂O 分子和 Mg²⁺ 配位, 并通过氢键和范德华力协助完成 E1PCa₂→E2P 变构和 E2P 去磷酸化^[4-6]. Y122 疏水性决定簇所处的位置决定其在 SERCA1a 的机械及能量传递过程中占据交通枢纽的重要地位. SERCA1a 结构中存在错综复杂的相互作用, 其结构域的活动和跨膜螺旋的构象变化密切相关, 而且可以通过 Ca²⁺、ATP、Pi、ADP、Mg²⁺ 等小分子结合或解离的方式调控该过程. 因此任何重要位置的单一氨基酸残基变异, 都可能通过 Y122 疏水性决定簇和 / 或结构域 - 跨膜螺旋连接部等进行远距离传递. L78 的 G862、P863 和 A893 单突变体检测结果提示 L78 的作用相当重要, 其单个氨基酸残基突变即可造成 SERCA1a 无法协调有序地进行构象变化及反应循环, 导致 SERCA1a 功能受到抑制.

本研究证实了 L78 部分氨基酸残基对 SERCA1a 的结构与功能至关重要. 对 L78 功能的解析, 可进一步完善对 SERCA1a 工作机制的理解, 尤其是一向被忽视的 M7-M10 部分. 此外, 由于 L78 具有重要的功能, 因此 L78 可作为药物设计的靶点. SERCA 抑制剂已经应用在前列腺癌和疟疾的治疗^[24-25], 并且具有广泛的应用前景. 由于 L78 结构和位置的特殊性, 与 SERCA 其他部位相比, 以 L78 为靶点设计的药物将可能具有更高的亲和力和特异性.

参 考 文 献

- [1] MacLennan D H, Rice W J, Green N M. The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco (Endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. *J Biol Chem*, 1997, **272**(46): 28815-28818
- [2] Carafoli E. Calcium-a universal carrier of biological signals. *FEBS Journal*, 2005, **272**(5): 1073-1089
- [3] Kühlbrandt W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, **5**(4): 282-295
- [4] Toyoshima C. Structural aspects of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys*, 2008, **476** (1): 3-11
- [5] Suzuki H. Structure and function of Ca²⁺ pump and diseases caused by its gene mutations. *Biochemistry (Japan)*, 2003, **75** (9): 1215-1224
- [6] Wang G, Yamasaki K, Daiho T, *et al.* Critical hydrophobic interactions between phosphorylation and actuator domains of Ca²⁺-ATPase for hydrolysis of phosphorylated intermediate. *J Biol Chem*, 2005, **280**(28): 26508-26516
- [7] Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, *et al.* Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6Å resolution. *Nature*, 2000, **405**(6787): 647-655
- [8] Toyoshima C, Nomura H. Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature*, 2002, **418**(6898): 605-611
- [9] Toyoshima C, Mizutani T. Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature*, 2004, **430**(6999): 529-535
- [10] Toyoshima C, Nomura H, Tsuda T. Lumenal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues. *Nature*, 2004, **432**(7015): 361-368
- [11] Toyoshima C, Iwasawa S, Ogawa H, *et al.* Crystal structures of the calcium pump and sarcolipin in the Mg²⁺- bound E1 state. *Nature*, 2013, **495**(7440): 260-264
- [12] Olesen C, Picard M, Winther A L, *et al.* The structural basis of calcium transport by the calcium pump. *Nature*, 2007, **450**(7072): 1036-1042
- [13] Kaufman R J, Davies M V, Pathak V K, *et al.* The phosphorylation state of eucaryotic initiation factor 2 alters translational efficiency of specific mRNAs. *Mol Cell Biol*, 1989, **9**(3): 946-958
- [14] Agilent Technology. QuikChange II XL site-directed mutagenesis kit instruction manual. <http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/Public/200521.pdf>
- [15] Maruyama K, MacLennan D H. Mutation of aspartic acid-351, lysine-352, and lysine-515 alters the Ca²⁺ transport activity of the Ca²⁺-ATPase expressed in COS-1 cell. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**(10): 3314-3318
- [16] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagents. *J Biol Chem*, 1951, **193**(1): 265-275
- [17] Daiho T, Yamasaki K, Suzuki H, *et al.* Deletions or specific substitutions of a few residues in the NH₂-terminal region(Ala³ to Thr⁹) of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase cause inactivation and rapid degradation of the enzyme expressed in COS-1 Cells. *J Biol Chem*, 1999, **274**(34): 23910-23915
- [18] Nakamura S, Suzuki H, Kanazawa T. The ATP-induced change of tryptophan fluorescence reflects a conformational change upon formation of ADP-sensitive phosphoenzyme in the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. Stopped-flow spectrofluorometry and continuous flow-rapid quenching method. *J Biol Chem*, 1994, **269**(23): 16015-16019
- [19] Daiho T, Kubota T, Kanazawa T. Stoichiometry of tight binding of magnesium and fluoride to phosphorylation and high-affinity binding of ATP, vanadate, and calcium in the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Biochemistry*, 1993, **32**(38): 10021-10026
- [20] Daiho T, Yamasaki K, Saino T, *et al.* Mutations of either or both Cys⁸⁷⁶ and Cys⁸⁸⁸ residues of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase result in a complete loss of Ca²⁺ transport activity without a loss of Ca²⁺-dependent ATPase activity. *J Biol Chem*, 2001, **276** (35): 32771-32778
- [21] Clarke D M, Loo T W, Inesi G, *et al.* Location of high affinity Ca²⁺-binding sites within the predicted transmembrane domain of the sarco-plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Nature*, 1989, **339**(6224): 476-478

- [22] Yamasaki K, Daiho T, Danko S, *et al.* Multiple and distinct effects of mutations of Tyr¹²², Glu¹²³, Arg³²⁴, and Arg³³⁴ involved in interactions between the top part of second and fourth transmembrane helices in sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase: changes in cytoplasmic domain organization during isometric transition of phosphoenzyme intermediate and subsequent Ca²⁺ release. *J Biol Chem*, 2004, **279**(3): 2202–2210
- [23] Yamasaki K, Wang G, Daiho T, *et al.* Roles of Tyr¹²²-hydrophobic cluster and K⁺ binding in Ca²⁺-releasing process of ADP-insensitive phosphoenzyme of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J Biol Chem*, 2008, **283**(43): 29144–29155
- [24] Denmeade S R, Isaacs J T. The SERCA pump as a therapeutic target: making a "smart bomb" for prostate cancer. *Cancer Biol Therapy*, 2005, **4**(1): 14–22
- [25] Uhlemann A C, Cameron A, Eckstein-Ludwig U, *et al.* A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinins. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, **12**(7): 628–629

Some Amino Acid Residues on L78 Affect Ca²⁺ Transport of SERCA1a*

WANG Guo-Li^{1)**}, DAIHO Takashi²⁾, YAMASAKI Kazuo²⁾, DANKO Stefania²⁾,
WANG Biao¹⁾, SU Wen-Hui¹⁾, SUZUKI Hiroshi^{2)**}

⁽¹⁾ Department of Biochemistry and Molecular Biology, China Medical University, Shenyang 110001, China;

⁽²⁾ Department of Biochemistry, Asahikawa Medical University, Asahikawa 078-8501, Japan)

Abstract Sarco-endoplasmic reticulum calcium transporting ATPase expressed in adult fast-twitch skeletal muscle (SERCA1a) utilizes energy from ATP hydrolysis to transport Ca²⁺ from cytoplasm into sarcoplasmic reticulum against the Ca²⁺ concentration gradient. By this means, the Ca²⁺ concentration in cytoplasm may decrease and contracted muscle cells relax. SERCA1a is the structurally and functionally best studied representative of the P-type ion transporting ATPase. Studies of SERCA1a may provide with enlightening information for research about other SERCA isoforms and P type ATPase. To understand the functional roles of the linker between the transmembrane helix M7 and the transmembrane helix M8 (L78), mutational studies about some L78 amino acid residues were performed to evaluate the effect of their single substitutions on the SERCA1a reaction cycle. Mutant SERCA1a cDNAs were obtained by Quick Change site directed mutagenesis. SERCA1a wild type and mutant proteins were expressed in COS-1 cells separately and extracted by microsome preparation. Single mutant SERCA1a proteins, wild type SERCA1a proteins and control microsomes were checked with radioactive [γ -³²P] ATP, ⁴⁵CaCl₂, and ³²Pi independently to determine their ATPase activities, Ca²⁺ transport rates, amount of total EP formed from ATP, and amount of E2P formed from Pi. Results showed that all single mutants except for G864A transported Ca²⁺ at lower rates than that of the SERCA1a wild type protein. Single mutations of G862 or P863 lead to severe decreases of the ATPase activity and the amount of EP formed from ATP or Pi. Measurements about ATP hydrolysis and EP formation of A893P gave data similar to those obtained from G⁸⁶² P⁸⁶³ single mutant proteins, whereas single mutants of G864 and FMQ873-875 did not induce significant reduction of ATPase activity and EP amount. Experimental results above indicated that L78 is involved in the Ca²⁺ transport across the endoplasmic reticulum membrane, and moreover, appropriate turns at GPG862-864 and near A893 are essential for D351 phosphorylation at the cytoplasmic domain P. Thereby it is suggested that the accurate configuration and flexibility of L78 play important roles for the successive conformational changes accompanying the SERCA1a reaction cycle.

Key words P-type ATPase, calcium ATPase, SERCA, site-directed mutagenesis, reaction cycle

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00524

*This work was supported by a grant from The Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

**Corresponding author.

WANG Guo-Li. Tel: 86-24-23256666-5477, E-mail: glwang@mail.cmu.edu.cn

SUZUKI Hiroshi. Tel: 81-166-68-2350, E-mail: hisuzuki@asahikawa-med.ac.jp

Received: February 18, 2014 Accepted: April 25, 2014