

文章编号: 1000-5013(2012)01-0060-05

新型杀虫晶体蛋白 Cry7Ab4 空间结构的计算机解析

洪雪梅¹, 林毅²

(1. 华侨大学 信息科学与工程学院, 福建 厦门 361021;

2. 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 采用一级结构分析, 二级结构预测及同源比对建模的方法, 模拟出新型杀虫晶体蛋白 Cry7Ab4 的空间结构, 并进行动力学优化. 结合其杀大猿叶甲活性数据与蛋白结构比对分析, 发现 Cry7Ab4 与 Cry7Aa1 的活性差异主要归因于 $\alpha 3, \alpha 4$ 上疏水性氨基酸的不同.

关键词: 苏云金芽孢杆菌; 杀虫晶体蛋白; Cry7Ab4; 空间结构; 构效关系

中图分类号: Q 518.1; TP 311.1

文献标志码: A

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)伴孢晶体蛋白 Cry7 在对鳞翅目、鞘翅目和直翅目等害虫的生物防治方面有着广阔的前景. 如 Cry7Aa 杀马铃薯甲虫(*Leptinotarsa decemlineata*), 其半数致死浓度(LC₅₀)为 $13.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[1]; Cry7Ba1 杀小菜蛾(*Plutella xylostella*), 3 d 的 LC₅₀ 值为 $0.0957 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; Cry7Ca1 杀蝗虫, 72 h 的 LC₅₀ 值为 $3.19 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[2]. Cry7 基因杀虫活性高, 但 Cry7Ab4 对鳞翅目的小菜蛾、甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)、亚洲玉米螟(*Ostrinia furnacalis*)、马铃薯甲虫(*Leptinotarsa decemlineata*)、榆蓝叶甲(*Pyrrhalta aenescens*)和直翅目的东亚飞蝗(*Oroental migratory locust*)基本无杀虫活性, 仅对鞘翅目的大猿叶甲(*Colaphellus bowwingi* Baly)有杀虫活性, 其 LC₅₀ 值为 $293.79 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[3]. 未做酶解的蛋白基本无杀虫活性, 有活性的只有 trypsin 酶解的蛋白. 在 Cry7Ca 基因也有相似情况: 酶解蛋白 72 h 的 LC₅₀ 值为 $3.19 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 而未酶解蛋白 72 h 的 LC₅₀ 值为 $9.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 酶解蛋白比未酶解蛋白活性高了 3 倍^[2]. 因此, 解析 Cry7 蛋白的空间结构, 探讨构效关系, 具有重大意义. Cry7Ab4 是从苏云金芽孢杆菌 HQ40 中克隆的一个新基因(登录号为 EU380678), 其编码产物的蛋白酶解液对鞘翅目的大猿叶甲有杀虫活性, 其 LC₅₀ 值为 $293.79 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[3]. 为探讨其构效关系, 本研究采用同源建模并经动力学优化获得了 Cry7Ab4 的空间结构, 通过与 Cry7Aa1 的比较分析, 发现其对大猿叶甲的活性差异主要归因于 $\alpha 3, \alpha 4$ 上疏水性氨基酸的不同.

1 材料与方法

1.1 材料

供试蛋白质(Cry7Ab4)序列为文献[3]实验筛选测序获得的.

1.2 分析方法

蛋白质二级结构的预测采用 PHD(<http://www.embl2.heidberg.de/predict.protein/predict-protein.html>), 利用 protparam(<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>)进行蛋白质理化性质

收稿日期: 2011-09-13

通信作者: 林毅(1976-), 男, 教授, 主要从事伴孢晶体蛋白的基因克隆与信息学的研究. E-mail: lyhxm@hqu.edu.cn.

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目(211205); 福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划项目(2006年度); 福建省自然科学基金资助项目(2011J01221); 植物病虫害生物化学国家重点实验室开放基金资助项目(2007IP7)

的预测,利用 SWISS-MODEL 服务器([http:// www. expasy. org/swiss-mod/](http://www.expasy.org/swiss-mod/) -SWISS-MODEL. html)进行同源建模. SMART 服务器([http:// smart. embl-heidelberg. de/](http://smart. embl-heidelberg. de/))进行对结构域分析,包括 3 个 DOMAIN 的位置. SeqFacts 服务器([http:// bip. weizmann. ac. il/sqfbin/seqfacts](http://bip. weizmann. ac. il/sqfbin/seqfacts))CDD v2. 10 服务器([http:// www. ncbi. nlm. nih. gov/Structure/cdd/cdd.shtml](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml))可找出提交序列的保守区域. 分子模型优化采用 ICM 软件. 图片编辑采用可视化工具 Chimera, Spdbv 与 Rasmol. BLAST ([http:// www. ncbi. nlm. nih. gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/))进行序列比对,或利用 Clustal X 软件进行多序列比对.

2 结果与分析

2.1 杀虫晶体蛋白 Cry7Ab4 氨基酸序列分析

2.1.1 杀虫晶体蛋白 Cry7Ab4 氨基酸组成 将杀虫晶体蛋白 Cry7Ab4 的一级序列提交给 Protparam 服务器,可得到该蛋白(核心毒蛋白,已截去 C 端和 N 端的部分序列)的氨基酸组成,如图 1 所示. 该蛋白含 585 个氨基酸,其中异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、丝氨酸(Ser)、酪氨酸(Tyr)的比例(γ)最高,分别为 7.52%,7.86%,8.03%,7.69%. 该蛋白相对分子质量为 66.79 kDa,理论上的 pI 值为 5.86,是弱酸性蛋白.

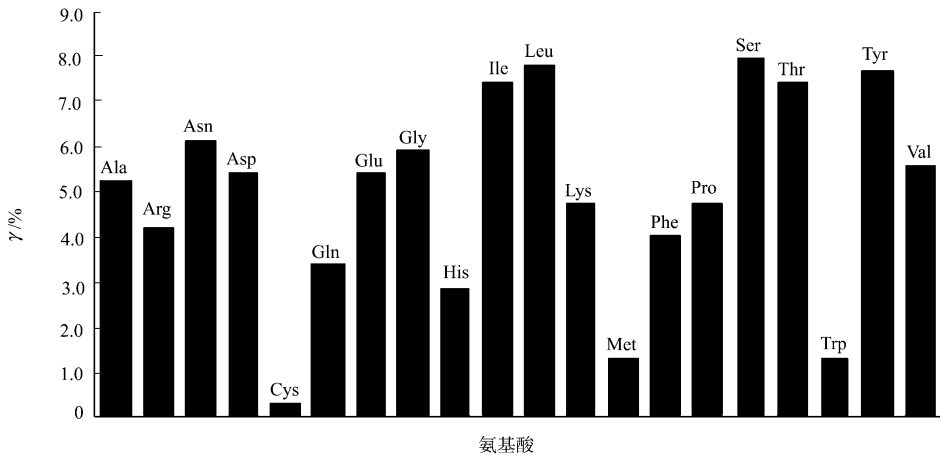


图 1 杀虫蛋白 Cry7Ab4 核心毒蛋白的 20 种氨基酸组成

Fig. 1 Amino acids composition of core toxic protein of Cry7Ab4

2.1.2 杀虫晶体蛋白 Cry7Ab4 二级结构预测 采用 PHD 程序对杀虫晶体蛋白 Cry7Ab4 二级结构进行预测. 结果表明,在该蛋白中各二级结构元件的摩尔分数: α -螺旋(177AA)为 27.96%,延伸链(144AA)为 22.75%,随机卷曲(312AA)为 49.29%. 在含 585 个氨基酸残基的 Cry7Ab4 蛋白中,大概存在 7 个较长的 α -螺旋区域,这些区域(约 30~260)主要分布在该蛋白的 N-端,其后区域则为 β -折叠和无规则卷曲, β -折叠相对较对较密地分布在 C-端.

2.1.3 杀虫晶体蛋白 Cry7Ab4 的结构域及功能位点 采用 SMART(正常形式)用于发现和注释遗传可移动蛋白多肽中的结构域(domain)及分析结构域(domain)的体系结构,结果如图 2 所示.



图 2 杀虫蛋白 Cry7Ab4 的结构域信息

Fig. 2 Information of Cry7Ab4 domains

根据已知的几种杀虫晶体蛋白的结构,提出如下列推测. Cry 蛋白 Domain I 的长疏水和亲水脂螺旋可能参与中肠上皮溶细胞孔洞的形成;Domain II 的 3 个 β -折叠顶部暴露在表面的环结构,由于与免疫球蛋白抗原结合位点相似,其中可能含有毒素结合到昆虫中肠刷状缘膜上特异性受体的决定性因子,参与起始与受体结合. 定点诱变与片段互换研究都支持这一推断^[4];Domain III 的 β “三明治”结构具有多种功能,在毒素分子的生物化学上,可以维持毒素分子三维结构的完整^[5],毒素与受体的相互作用导致形成孔洞. 研究表明: β “三明治”结构能够参与受体结合^[6]、膜穿透^[7]和离子通道功能^[8].

2.2 杀虫晶体蛋白 Cry7Ab4 空间结构的同源建模及优化

将杀虫晶体蛋白 Cry7Ab4 序列提交到 Swiss Model 服务器,在 Tools 中的 Template Identification 中寻找到具有晶体结构的模板,发现其同源性最高为 40%,PDB 的 ID 号 1dlcA (insecticidal crystal protein Cry2Aa). 将杀虫晶体蛋白 Cry7Ab4 与模板 1dlcA_B2 的氨基酸序列比对,由于同源性较低,在进行同源建模时可采用比对建模,其模板为 1dlcA. 提交杀虫晶体蛋白 Cry7Ab4 与模板 1dlcA 的氨基酸序列比对结果到 Swiss-Model 服务器,进行自动建模,同源模建返回的初始结构在 ICM 可视化.

对同源模建的 Cry7Ab4 初始三维结构进行结构优化和动力学模拟,先用最陡下降法 (steepest descent) 在 CVFF (consistent-valence forcefield) 力场下进行 100 步的结构松弛计算,接着采用 200 步的共轭梯度法 (conjugate gradient) 进行结构优化,最终把 Ramachadran Plot 得分控制在 92% 以上,得到一个比较可靠的三维结构图,如图 3 所示.

2.3 Cry7Ab4 与 Cry7Aa1 的结构差异

目前已发现的 Cry7A 类基因共 6 种,其中 Cry7Ab 基因共 5 种. 在这些已发现的 Cry7A 类基因中,杀虫活性生测比较多的是 Cry7Aa1,它对马铃薯甲虫有较强的杀虫活性,其他蛋白杀虫活性未见报道. 通过序列比对(图 4),Cry7Ab4 与 Cry7Aa1 的同源性为 93.84%,部分差异氨基酸如表 1 所示.

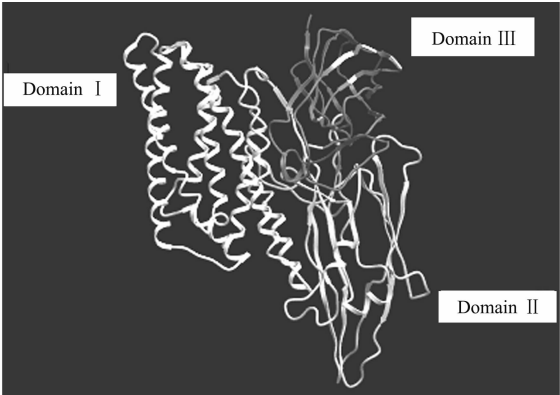


图 3 同源模建修正后 Cry7Ab4 三维结构
Fig. 3 Tertiary structure of Cry7Ab4 modified by homologous modeling

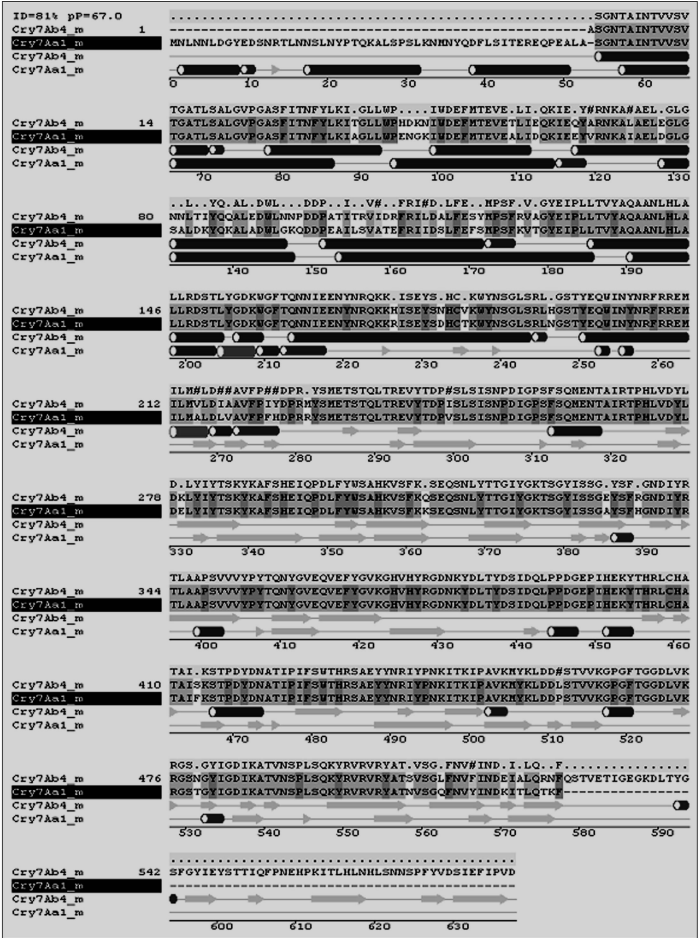


图 4 杀虫晶体蛋白 Cry7Ab4 与 Cry7Aa1 多序列比对结果

Fig. 4 Alignment of the amino acid sequence between Cry7Ab4 and Cry7Aa1 toxins

由表 1 可知:杀虫晶体蛋白 Cry7Ab4 与 Cry7Aa1 主要氨基酸差异多处位于结构域 I ,共有 41 个氨基酸差异,Cry7Ab4 蛋白有 17 个亲水性氨基酸,占差异氨基酸总数的 41. 46%, Cry7Ab1 蛋白有 21 个亲水性氨基酸,占差异氨基酸总数的 51. 22%. Cry7Ab4 中亲水性氨基酸明显低于 Cry7Aa1,低了 9. 7 个百分点.

表 1 Cry7Ab4 与 Cry7Aa1 空间结构上对应的氨基酸差异
Tab. 1 Amino acid difference between Cry7Ab4 and Cry7Aa1 in single domains

| 结构域 | Domain I (53-281) | Domain II (286-487) | Domain III (497-637) |
|---------|---------------------------------|---------------------|----------------------|
| Cry7Ab4 | THDKNTEQENNTIQENNPATDRASYRAHVHM | KQES | NSLERN |
| Cry7Ab1 | AENGKADEDSADKKAGQEATESFSKTRTNR | EKAF | TNQKTK |

在这两个模型中的共同点是结构域 I 与蛋白在害虫细胞膜上的钻孔活动有关, $\alpha 5, \alpha 6$ 和顶部的环状结构为疏水性氨基酸与钻孔有关,其他部分为亲水性氨基酸,位于周围液态环境中,促进钻孔后与细胞膜的结合稳定性. 这部分的氨基酸亲水性越强,杀虫晶体蛋白与细胞膜的结合越稳定,所以杀虫活性相对也就强.

比较 Cry7Ab4 与 Cry7Ab1 的空间结构时,发现它们之间的氨基酸差异主要分布在 $\alpha 3, \alpha 4$ 两个亲水性螺旋上,如图 5 所示. 在本研究中,可以发现 Cry7Ab4 的杀虫活性(LC_{50})为 $293. 79 \mu g \cdot mL^{-1}$,而 Cry7Ab1 的杀虫活性(LC_{50})为 $13. 1 \mu g \cdot mL^{-1}$, Cry7Ab1 的杀虫活性高于 Cry7Ab4,其原因可能与这部分氨基酸的亲水性有关.

3 讨论

杀虫活性模型有两个,一是“umbrella”模型,Cry 蛋白 Domain I 的疏水 $\alpha 4, \alpha 5$ 螺旋形成发夹结构起始孔洞的形成. 1997 年, Schwartz 等^[9]在 Cry1Ab 蛋白 Domain I 和 Domain I 与 Domain II 之间引入二硫键限制分子内运动. 研究结果表明: $\alpha 4, \alpha 5$ 螺旋的发夹结构插入上皮膜,Domain I 的其他部分以“伞状”平铺于膜表面. 1999 年, Yaoi 等^[10]分析了 Cry1Aa 蛋白与家蚕 (*Bombyx mori*) 氨肽酶(Aminopeptidase N, APN)的结合区,证明是位于 Domain I 的 135-Ile 和 198-Pro 之间,也就是 $\alpha 4, \alpha 5$ 螺旋. Masson 等^[11]研究了 Cry1Aa 蛋白 DomainI 的 $\alpha 4$ 螺旋的各位点突变对小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 结合的影响,发现 $\alpha 4$ 螺旋带电荷的 Asp-136 是维持 Cry1Aa 对小菜蛾毒性最重要的位点. 2000 年, Gerber 等^[12]进一步诱变 Cry1Ac Domain I 的 $\alpha 4, \alpha 5$ 螺旋间的 loop,也证明 $\alpha 4, \alpha 5$ 螺旋与孔洞形成有关.

另一个模型是 1990 年 Hodgman 和 Ellar^[13]提出的“铅笔刀”模型. 疏水 $\alpha 5, \alpha 6$ 加上顶部的环状结构,打开成“铅笔刀”形式插入上皮膜,其余部分在膜或受体表面. 目前这个模型的证据较少. 这两个模型都表明杀虫晶体蛋白空间结构上的 $\alpha \alpha$ 螺旋是非常关键的区域.

本研究通过系统的分析发现,Cry7Ab4 与 Cry7Ab1 之间的氨基酸差异主要分布在 $\alpha 3, \alpha 4$ 两个亲水性螺旋上,据此推测其杀虫活性差异主要归因于 $\alpha 3, \alpha 4$ 螺旋的亲水性差异. 研究结果与上述两个模型所揭示的 $\alpha \alpha$ 螺旋是 Cry 蛋白上极其关键的区域的事实相吻合. 今后可围绕 Cry7Ab 蛋白的的 $\alpha \alpha$ 螺旋区域,实施随机和定点突变,进一步深入探讨其构效关系.

参考文献:

[1] LAMBERT B, THEUNIS W, AGUDA R, et al. Nucleotide sequence of gene cry III D encoding a novel coleopteran-active crystal protein from strain BT1109P of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*[J]. Gene, 1992, 110(1): 131-132.

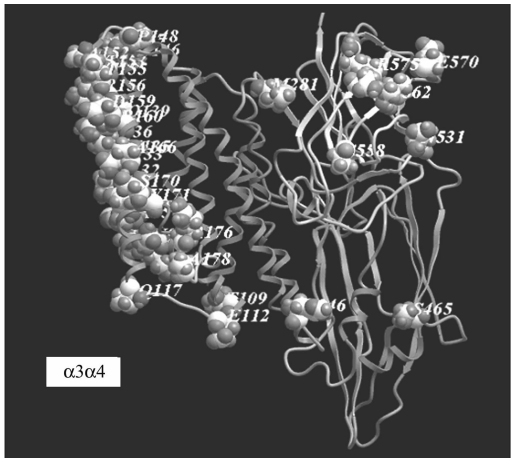


图 5 差异氨基酸在 Cry7Ab4 中的分布图
Fig. 5 Distribution of the diversity amino acids in Cry7Ab4

[2] SONG L,GAO M,DAI S,et al. Specific activity of a *Bacillus thuringiensis* strain against *Locusta migratoria* manilensis[J]. J Invertebr Pathol,2008,98(2):169-176.

[3] 邓淑,束长龙,林毅,等. 新型 Cry7Ab 基因的鉴定、克隆、表达与杀虫活性[J]. 农业生物技术学报,2009,5:908-913.

[4] SCHNEPF E,CRICKMORE N,VAN RIE J L,et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal protein[J]. Microbiol and Molecular Biology Review,1998,62(3):775-806.

[5] LI J,CARROLL J,ELLAR D J. Crystal structure of insecticide δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution[J]. Nature,1991,353:815-821.

[6] CHOE S,BENNETT M J,FUJII G,et al. The crystal structure of diphtheria toxin[J]. Nature,1992,357:216-222.

[7] OJCIUS D M,YOUNG J D E. Cytolytic pore-forming proteins and peptides: Is there a common structural motif? [J]. Trends in Biochemical Sciences,1991,16(6):225-229.

[8] YOOL A J. Block of the inactivating potassium channel by clofilium and hydroxylamine depends on the sequence of the pore region[J]. Molecular Pharmacology,1994,46(5):970-976.

[9] SCHWARTZ J L,JUTEAU M,GROCHULSKI P,et al. Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering[J]. FEBS Letters,1997,410(2/3):397-402.

[10] YAOI K,NAKANISHI K,KADOTANI T,et al. *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin-binding region of *Bombyx mori* aminopeptidase N[J]. FEBS Letters,1999,463(3):221-224.

[11] MASSON L,MAZZA A,GRINGORTEN L,et al. Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins is highly dependent on the bioassay system[J]. Molecular Microbiology,1994,14(5):851-860.

[12] GERBER D,SHAI Y. Insertion and organization within membranes of the δ -endotoxin pore-forming domain, helix 4-loop-helix 5, and inhibition of its activity by a mutant helix 4 peptide[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000,275(31):23602-23607.

[13] HODGMAN T C,ELLAR D J. Models for the structure and function of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins determined by compilational analysis[J]. DNA Sequence,1990,1(2):97-106.

Structural Analysis of a Novel Insecticidal Crystal Protein Cry7Ab4

HONG Xue-mei¹, LIN Yi²

(1. College of Information Science and Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;
2. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The initial spatial structure of a novel insecticidal crystal protein Cry7Ab4 was constructed by primary structure analysis, secondary structure prediction and homologous alignment modeling, and then optimized by molecular mechanics method. In addition, the structural difference between Cry7Ab4 and Cry7Ab1 was compared by NCBI Blastp. It showed that the hydrophobic amino acids in $\alpha 3, \alpha 4$ were responsible for their difference of insecticidal activities against *Colaphellus bowringi*.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; insecticidal crystal protein; Cry7Ab4; spatial structure; structure-activity relationship

(责任编辑: 钱筠 英文审校: 刘源岗)