

文章编号: 1000-5013(2012)04-0408-04

Ⅱ 型抗癌晶体蛋白的芳香族氨基酸 及其与抗肝癌活性间的关系

陈爱明, 林毅

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 利用氨基酸序列比对, 蛋白质间相互作用位点预测和蛋白质与蛋白质对接, 研究Ⅱ型抗癌晶体蛋白的氨基酸组成与其抗肝癌活性之间关系. 结果表明: Ⅱ型抗癌晶体蛋白分子上位点 49, 51, 52, 55~60, 194 和 205~212 的氨基酸残基, 特别是芳香族氨基酸在配体和受体蛋白质间的相互作用中起着重要作用; 在 Hex 的蛋白质与蛋白质对接中, 配体 P11 和 P32 与受体甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的结合能量最低, 表明 P11 和 P32 更容易与 GAPDH 结合.

关键词: Ⅱ型抗癌晶体蛋白; 苏云金芽孢杆菌; 芳香族氨基酸; 分子对接; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

中图分类号: Q 511.04; Q 78

文献标志码: A

研究者发现某些不具有杀虫活性的菌株产生的 Cry 蛋白对多种脊椎动物细胞包括人类肿瘤细胞有细胞毒杀活性^[1-3], 这类蛋白按照苏云金芽孢杆菌细胞毒素蛋白的命名方法确定为 parasporin 蛋白^[4]. 目前已经分离、鉴定出来了 6 种 parasporin 蛋白, 其中 parasporin-2 蛋白前体的 N-端和 C-端经过胰蛋白酶 K 处理后, 余下的中间片段是一段分子大小为 30 kDa 的多肽链, 该多肽链是一种高效的细胞毒素, 能够识别人类的癌细胞^[3]. 从生化分析来看, parasporin-2 似乎导致了细胞质从质膜内流出, 因为检测到乳酸脱氢酶从细胞胞内快速泄露^[5]. 为此, 研究人员做了一系列的实验发现, parasporin-2 蛋白诱发的细胞裂解需要糖基磷脂酰肌醇 (GPI)-锚定蛋白参与^[6]. Bt18 菌株产生的 parasporin 蛋白诱导人类白血病癌细胞 CEM-SS 的裂解需要与 CEM-SS 质膜上面的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)结合^[7]. Parasporin-4 蛋白诱发的细胞裂解需要与细胞质膜上面的胆固醇结合^[8]. 就 parasporin-2 蛋白分子结构来看, 它的分子三维模型从纵向上可以分成 3 个结构域, 其中在第 1 结构域上暴露出来的芳香族氨基酸残基很可能是靶细胞质膜受体结合的位点, 而这些受体可能是细胞质膜上面的膜蛋白糖链, 也可能是细胞质膜上面的脂筏所聚集的磷脂^[9]. 但与 parasporin-2 蛋白识别并结合的具体受体目前还不清楚. 由于 Bt18 菌株产生的 parasporin 蛋白和 parasporin-2 蛋白是同一个蛋白家族, 同时在诱导细胞死亡方面具有相似的生化特征. 因此, 本文以新型受体蛋白 GAPDH 作为 parasporin-2 蛋白的受体, 利用氨基酸序列分析、分子对接等实验, 来研究Ⅱ型抗癌晶体蛋白的氨基酸序列与其抗癌活性之间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料

实验采用以下软件和数据库: BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>) 氨基酸序列比对软件; 预测蛋白质间相互作用位点的软件 Molsoft-icmpro (<http://www.molsoft.com/>); 蛋白质与蛋白质对接软件 Hex4.5 (<http://www.loria.fr/~ritchied/hex/>); 生物信息学服务器 Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>); 数据库 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). 9 个突变

收稿日期: 2011-11-22

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); 福建省自然科学基金资助项目(2011J01221); 福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划(2006 年度)

蛋白,分别是 P11,P12, P13,P14,P21,P22,P31,P32 和 P33,用于比对的原始蛋白是 P2.

1.2 方法

首先,读取 9 个突变蛋白和比对的原始蛋白文件到 BioEdit 软件中,利用“sequences”功能将 DNA 序列翻译成蛋白质序列,再将突变蛋白的蛋白质序列与 P2 的蛋白序列进行比对,分别以文本格式保存 9 个突变蛋白的氨基酸序列.

其次,从 NCBI 数据库中获取甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH). 在 Swiss-model 服务器上将前面保存的蛋白序列文本文件转化成 pdb 文件,然后读取蛋白的 pdb 文件到 Molsoft-icmpro 软件中,利用最佳结合位点功能(ODA,能够识别蛋白表面最低对接能量值所在的位点,而能量值是通过辛醇/水的转化实验中原子的溶解参数(ASP)按照蛋白质与蛋白质对接做相应调整计算得来)去预测蛋白质表面涉及到蛋白质和蛋白质相互作用的位点.

最后,分别将受体分子 GAPDH 和配体分子突变蛋白的 pdb 文件读入到 Hex 软件中进行蛋白质与蛋白质对接能量计算. 在进行对接之前,去掉水分子和其他杂质分子. 对接之时,“correlation type”选择“Shape+Electronic”,“solutions”的数量选择 2 000,同时对后期处理选择“Bumps”,其他运行条件采用 Hex 软件的默认值^[10].

表 1 差异氨基酸残基

Tab. 1 Discrepancy of amino residues

蛋白名称	差异氨基酸残基
P11	Gly32Ser, Thr225Ala, Val242Ala.
P12	Ile102Met,Val131Ala, Asp217Glu
P13	Gly32Ser, Val203Ala, Ala215Asp
P14	Gly32Ser
P21	Gly32Ser, Thr225Ala, Val242Ala, Gln252Arg
P22	Gly32Ser, Ser182Cys, Thr225Ala, Val242Ala
P31	Gly32Ser, Thr225Ala, Val242Ala
P32	Gly32Ser, Glu148Asp, Lys158Ile, Ser182Cys, Asp184Tyr, Gly206Val, Thr225Ala
P33	Arg5Leu, Gly32Ser, Thr225Ala, Val242Ala

2 结果与讨论

2.1 差异氨基酸残基检测

通过 BioEdit 软件检测突变蛋白的氨基酸序列差异. 与原始蛋白 P2 相比较,大部分突变蛋白有 3~7 个氨基酸差异,这些氨基酸大主要分布在位点 32,131,217,225 和 242,如表 1 所示.

2.2 蛋白质间相互作用的最佳位点预测

利用 Molsoft-icmpro 软件上的最佳结合位点功能(ODA),预测蛋白质表面参与到蛋白质和蛋白质间相互作用的位点. 图 1(a)是作为配体的 P32 在蛋白质和蛋白质间相互作用中起关键作用的氨基酸残基:苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)和酪氨酸(Y)(小球所在的区域),即有苯环的凹槽内. 图 1(b)是作为受体分子(GAPDH)在蛋白质间相互作用中起关键作用的氨基酸残基:天冬氨酸(D)、赖氨酸(K)、异亮氨酸(I)、缬氨酸(V)和丙氨酸(A)(小球所在的区域),主要在外围的凹槽内. 图 1 中:小球代表参与蛋白质和蛋白质间相互作用的区域,小球的体积越大,表示该区域参与到蛋白质和蛋白质间相互作用的可能性越大;反之,表示该区域参与到蛋白质和蛋白质间相互作用的可能性越小.

9 个突变蛋白参与到蛋白质和蛋白质间相互作用的氨基酸残基,如表 2 所示. 每个突变蛋白含有 333 个氨基酸,大约有 11~17 个氨基酸残基参与到蛋白质之间的相互作用,通过能量值计算发现配体蛋白的芳香族氨基酸对蛋白质间相互作用的贡献相对较大. 从表 2

可以看出:与正常的抗癌晶体蛋白(P2)相比,突变蛋白 P32 有两个显著不同的地方. 其一是在位点 194 的酪氨酸,在正常情况下它并不会参与到蛋白质间的相互作用中去,但在 P32 蛋白中位点 194 的酪氨酸参与了蛋白质间相互作用而且有一定的贡献;另一个是在位点 205 的脯氨酸,在正常情况下它是参与了蛋白质间的相互作用的,但在 P32 蛋白中位点 205 的脯氨酸几乎不参与蛋白质间的相互作用.

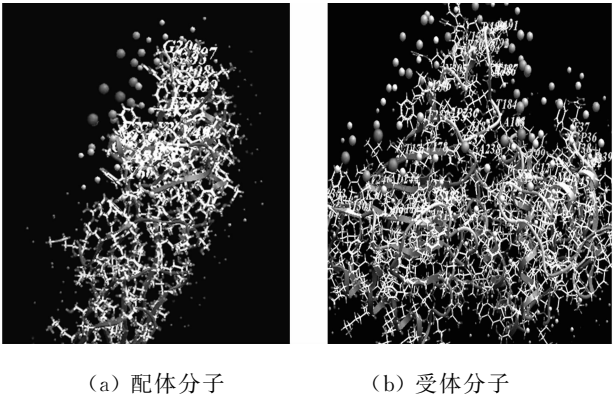


图 1 预测蛋白质表面高度参与蛋白质间相互作用的区域
Fig. 1 Regions predicted on protein surface which are highly likely to be involved in protein-protein interaction

2.3 蛋白质与蛋白质对接结果

通过预测蛋白质间相互作用的位点,同时获得了受体和配体蛋白质分子上很有可能参与到蛋白质间相互作用的氨基酸位点信息.在受体分子 GAPDH 上,最有可能参与结合的氨基酸是酪氨酸,而配体分子抗癌晶体蛋白最有可能参与结合的氨基酸是芳香族氨基酸.一般来说,在进行 Hex 软件的蛋白质与蛋白质分子对接时,受体和配体分子之间的距离不应超过 3.0 nm.经过分子对接试验,抗癌晶体蛋白和 GAPDH 在分子距离为 0.8 nm 时,其空间相对位置利于形成有效的受体配体复合物,因此进行正式分子对接时配体和受体的空间距离采用的是 0.8 nm.

蛋白质分子间对接的最终结果受到能量(E-total)、电子力(E-force)、E 构型(E-shape)、V 构型(V-shape)和 V 碰撞(V-clash)的影响,如表 3 所示.每个参数的数值越低,受体和配体分子间的结合就越容易.由于配体分子有 30 个正电荷和 33 负电荷,在进行分子对接时会影响蛋白分子间的相互作用,综合考虑分子结合能量和分子的电荷量这两个因素,以 GAPDH 作为受体时,在 9 个突变蛋白中发现 P11 和 P32 具有最低的总能量(E_{tot}),如图 2 所示.

表 3 蛋白质与蛋白质分子对接结果					
Tab. 3 Result of protein-protein docking					$\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
突变蛋白编号	E-total	E-shape	E-force	V-shape	V-clash
P11	-546.50	-484.80	-61.80	605.00	0
P12	-556.20	-549.70	-6.50	914.40	11.70
P13	-538.50	-501.50	-37.00	806.00	8.10
P14	-537.10	-508.50	-28.60	567.30	0
P21	-542.90	-492.20	-50.70	721.80	1.70
P22	-519.80	-520.60	0.80	740.20	0
P31	-532.50	-539.70	7.10	803.20	2.90
P32	-571.80	-500.30	-71.60	814.10	9.00
P33	-560.40	-577.90	17.50	710.10	0

3 结论

本实验室获得了 9 个与 parasporin-2 蛋白有 3~7 个氨基酸差异的突变蛋白.从前期实验结果来看,这 9 个突变蛋白对肝癌细胞的半致死剂量(LD_{50})相差很大,最小的是 $0.957\ 408\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,最大的是 $37.292\ 550\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.因此推测这 9 个突变蛋白的氨基酸和它们的抗癌活性存在着一定的相关性.

从蛋白质与蛋白质的分子对接结果可以发现,GAPDH 作为受体分子时,配体分子 P32 具有最低的结合能量.通过 Molsoft-icmpro 软件的 ODA 功能和 BioEdit 软件,发现在配体 P32 蛋白分子上既发生了突变同时又参与了蛋白质间相互作用的氨基酸残基为酪氨酸.这个小小的突变产生了一个有意思的现象:在氨基酸位点 194 的酪氨酸残基正常情况下并没有参与到蛋白质间相互作用,而在突变蛋白中却高度参与到蛋白质间的相互作用.

表 2 参与蛋白质间相互作用的氨基酸残基及位点信息

Tab. 2 Amino residues and sites involved in protein-protein interaction

氨基酸位点	突变蛋白编号								
	P11	P12	P13	P14	P21	P22	P31	P32	P33
49	V	V	V	V	V	V	V	V	V
51	P	P	P	P	P	P	P	P	P
52	P	P	P	P	P	P	P	P	P
55		A	A	A	A		A	A	A
56		Q	Q	Q	Q		Q	Q	Q
57		Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y
58		G	G	G	G		G	G	G
59		Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y
60		Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y
194								Y	
205	P	P	P	P	P	P	P		P
206	G	G	G	G	G	G	G	V	G
207	G	G	G	G	G	G	G	G	G
208	H	H	H	H	H	H	H	H	H
209	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
210	F	F	F	F	F	F	F	F	F
211	W	W	W	W	W	W	W	W	W
212	F	F	F	F	F	F	F	F	F

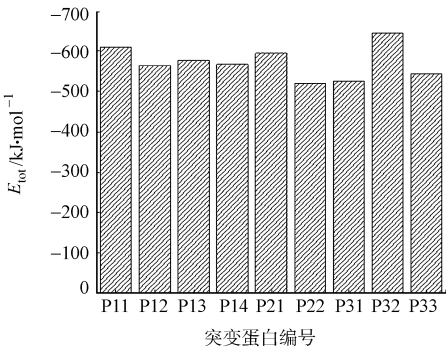


图 2 9 个突变蛋白的能量和电荷间相互作用力总值

Fig. 2 Total values of energy and charge interaction force of nine mutated proteins

综合考虑这 9 个抗癌晶体蛋白,在位点 49,51,52,55~60,194 和 205~212 的氨基酸残基都高度参与到了蛋白质间的相互作用. 这些氨基酸大部分都是芳香族氨基酸,如色氨酸(W)、酪氨酸(Y)、苯丙氨酸(F). 这些发现在一定程度上揭示了 II 型抗癌晶体蛋白的氨基酸组成与其抗肝癌活性之间关系,而要更好地了解他们之间的关系还需要进行深入的研究.

参考文献:

- [1] MIZUKI E, OHBA M, AKAO T, et al. Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: In vitro cell-killing action on human cancer cells[J]. Journal of Applied Microbiology, 1999, 86(3): 477-486.
- [2] LEE D W, AKAO T, YAMASHITA S, et al. Noninsecticidal parasporal proteins of a *Bacillus thuringiensis* serovar shandongiensis isolate exhibit a preferential cytotoxicity against human leukemic T cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 272(1): 218-223.
- [3] ITO A, SASAQURI Y, KITADA S, et al. A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic action to human cells[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(20): 21282-21286.
- [4] MIZUKI E, PARK Y S, SAITOH H, et al. Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*[J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2000, 7(4): 625-634.
- [5] ABE Y, KITADA S, KUGE O, et al. Oligomerization of parasporin-2, a new crystal protein from non-insecticidal *Bacillus thuringiensis*, in lipid rafts[C]//6th Pacific Rim Conference on the Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its Environmental Impact. Victoria B C: [s, n], 2005: 113-115.
- [6] KITADA S, ABE Y, MAEDA T, et al. Parasporin-2 requires GPI-anchored proteins for the efficient cytotoxic action to human hepatoma cells[J]. Toxicology, 2009, 264(1/2): 80-88.
- [7] KRISHNAN K, KER J E A, MOHAMMED S M, et al. Identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a binding protein for a 68 kDa *Bacillus thuringiensis* parasporal protein cytotoxic against leukaemic cells[J]. Journal of Biomedical Science, 2010, 17(1): 86.
- [8] OKUMURA S, SAITOH H, ISHIKAWA T, et al. Mode of action of parasporin-4, a cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2011, 1808(6): 1476-1482.
- [9] AKIBA T, ABE Y, KITADA S, et al. Crystal structure of the parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* toxin that recognizes cancer cells[J]. Journal of Molecular Biology, 2009, 386(1): 121-133.
- [10] 岳俊杰, 冯华, 梁龙. 蛋白质结构预测实验指南[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.

Relationship Between Aromatic Amino Acids of Parasporin-2 and its Anti-Liver-Cancer Activity

CHEN Ai-ming, LIN Yi

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: In this study, amino sequences blast, protein-protein interaction sites prediction and protein-protein docking were employed to explore the relationship between amino acid composition of parasporin-2 and its anti-liver-cancer activity. The results showed that amino residues, especially the aromatic amino residues at sites 49, 51, 52, 55-60, 194 and 205-212 in parasporin-2 were found to play a key role in ligand-receptor interaction. Protein-protein docking on Hex illustrated that ligands P11 and P32 had lower total binding energy value than the others when glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was the receptor, indicated that P11 and P32 were easier to bind to GAPDH.

Keywords: parasporin-2; *Bacillus thuringiensis*; aromatic amino acids; molecular docking; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

(责任编辑: 钱筠 英文审校: 刘源岗)