科 学 通 报
第 39 卷 第 24 期 CHINESE SCIENCE BULLETIN 1994 年 12 月

空间生长的溶菌酶晶体的结构研究*

董 君 韩 青 储乃明 毕汝昌**
(中国科学院生物物理研究所，北京 100101)

关键词 鸡蛋清溶菌酶、微重力、晶体结构、蛋白质、晶体学修正

作为一种酶，动物溶菌酶能选择性地切断细菌胞壁肽聚糖中N- 乙酰葡糖胺的某种糖苷键．鸡蛋清溶菌酶由含 129 个氨基酸的肽键构成，并含有 4 个二硫键．该酶是最早被测定三维结构的酶，目前已知三斜、单斜、正交和四方等几种晶型鸡蛋清溶菌酶的晶体结构，近年来还解得了与底物类似物复合物的 1.5Å 分辨率的结构[1]，但发表的不带配体酶结构的分辨率很少高于 2Å．微重力条件下的蛋白质晶体生长是利用航天器在空间进行生物大分子晶体生长的实验．通过多国科学家的努力，已从空间得到了优于地面结晶的蛋白质单晶体．经X射线衍射实验证明，一些在空间得到的蛋白质晶体的衍射分辨率比地面上生长的晶体要高，但独立用于测定三维结构的却不多见．1992 年 8 月，我们首次用我国研制的装置，在我国返回式卫星 FSW-2 上成功地完成了系列蛋白质的结晶实验[2]，其中获得了鸡蛋清溶菌酶四方晶体，其 X 射线衍射分辨率高达 1.6Å．本文报道对该晶体的结构研究及其初步结果．

1 材料和方法

1.1 结晶

在返回式卫星(微重力水平 $<10^{-4}$g)上的国产装置里，采用管式汽相扩散结晶技术[2]生长晶体，结晶温度为(18.5±0.5)℃．其他结晶条件类似于通常生长四方晶型鸡蛋清溶菌酶晶体的条件[3]：溶菌酶(Sigma 公司生产)浓度为 30mg/mL，蛋白质溶液含 1.5% NaCl 和乙酸-乙酸钠缓冲液(pH4.5)，平衡液为含较高浓度 NaCl 的缓冲液．与通常用于生长四方晶型溶菌酶晶体条件最大不同处是向蛋白质溶液加了 1.5% 2-甲基-2,4-戊二醇．经 X 射线徘循照相和面探测器系统测定，在空间生长了近 2 周的晶体的空间群为 $P4_32_12$，晶胞参数 $a=b=7.858$nm，$c=3.831$nm.

1.2 数据收集

在本所生物大分子国家重点实验室里的 SIEMENS X-200B 面探测器系统上，用 Cukα 射线，对空间生长的溶菌酶晶体(1.1 mm×0.6mm×0.5mm)收集了衍射数据．共收集 42148 个反射，经XENGEN 软件包处理，获得 14399 个独立反射，分辨率达 1.6Å 的完全度为 86.2%，由对称性相关反射计算的 R_{sym} 因子为 5.83%.

1994-07-25 收稿．
* 国家高技术发展计划资助项目．
** 联系人．

1.3 结构修正

采用 PDB 蛋白质数据库中的晶胞参数接近的、分辨率最高的四方鸡蛋清溶菌酶结构(标识码 6LYZ)[4] 为初始模型，进行了晶体学结构修正．衍射数据取 6.41—1.6Å 分辨率范围内大于 $2\sigma(F)$ 的数据(约占总点数的 98.7%)，不考虑溶剂分子，用初始模型计算出的 R 因子为 0.415. 先采用 XPLOR 程序包的模拟退火修正技术[5] 使 R 因子降至 0.251，再经过几轮位置和温度因子修正，R 因子降到 0.220. 以后就用修正后的模型计算 $2F_o$-F_c 和 F_o-F_c 电子密度图，根据这些密度图用 FRODO 程序[6] 对模型进行了小的调整．紧接着完成了几轮位置和温度因子修正，并在中间穿插进行按省略电子密度图人工调整某些密度表现不太好的残基(如 R21, R45, R61, P70-R73, K96, R125 等)，这使得 R 因子降至 0.209. 在这个阶段，又根据在 $2F_o$-F_c 和 F_o-F_c 两种图里的密度表现及周围原子的作用环境加了 150 个水分子．再经几轮位置和温度因子修正，R 因子降到 0.185，键长和键角相对标准值的 rms 偏离分别为 0.0014nm 和 2.562°.

表 1　结构修正的最后统计数据

空间群		$P4_32_12$
晶胞参数		$a=b=7.858$nm, $c=3.831$nm
分辨率范围		6.41—1.6Å
反射数		14344
反射数($F>2.0\sigma(F)$)		14152
非氢蛋白质原子数		1001
钙离子数		1
氯离子数		1
水分子数		171
R 因子		0.166
相对理想值的 rms 偏离	键长	0.0011nm
	键角	0.0036nm

然后，再采用 PROLSQ 程序[7]对结构继续进行修正，并对水分子进行了占有率修正．这当中，根据修正结果和原子所处的环境将其中的 160 位和 161 位的水分子分别改为金属钙离子和氯离子，又加了一些水分子，微调了几个侧链，一直修到 R 因子收敛为止．最后得到的 R 值为 0.166，键长和键角距离相对标准值的 rms 偏离分别为 0.0011nm 和 0.0036nm(表 1).

2 结果和讨论

最后一轮结构修正的统计数据列于表 1 中．从电子密度图的表现可以看出，蛋白质肽链与密度有较好的吻合，其他研究[4,8] 指出的几处密度表现不好的一些侧链，在我们的密度图中也有较好的表现．修正后的蛋白质原子的温度因子分布是合理的，除了遵守一般的规律外，通过与同晶型模型 2LYM[8] 的温度因子相比较发现，现模型的温度因子普遍偏低，特别是那些具有较高温度因子的分子表面环区或转角残基．构象角作图表明绝大部分氨基酸的 (Φ,Ψ) 角都落在允许区内，只有个别残基的 (Φ,Ψ) 偏离完全允许区稍大，但这在其它已知的同晶型结构模型中也是如此．值得提起的是与同晶型模型 2LYM[8] 的一个显著差异：N74 残基在模型 2LYM 中处在左手螺旋构象区，而在现模型里，它的构象却落在 Φ 角左移了近 180° 的允许区内．我们对 S72 等位残基计算了省略电子密度图(图 1)，现模型 72 位残基侧链构象与该图吻合得较好，而与模型 2LYM 的 72 位残基构象显著不同．S72 残基构象的这一变化与 N74 残基的构象改变是相关的，N74 位残基的二面角 Φ 近 180° 的变化，使得 S72 和 R73 残基不可能再占有类似模型 2LYM 中的方位，这样，S72OG 和 R73O 两原子才有可能成为下述钙离子的配体．最小二乘叠合比较指出，现模型与同晶型模型 2LYM[8] 的 rms 位移为 0.0296nm，但与作为修正初始模型的另一个同晶型结构 6LYZ[4] 的 rms 位移却加大到 0.0346nm，一个原因

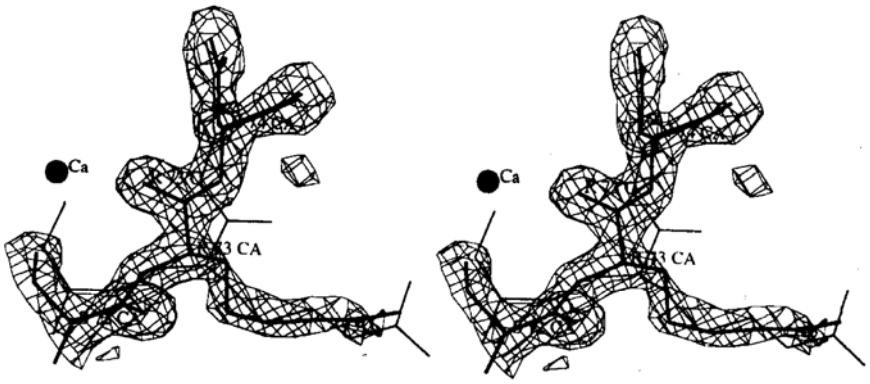

图 1 S72-N74 区域的 $(F_o\text{-}F_c)$ 电子密度图

用于计算 F_c 的现模型省略了 S72-N74 肽段，轮廓线水平取值 3σ. 图中配上了现结构模型骨架 (粗黑线) 及叠合在上的模型2LYM 的相应肽段 (细黑线), 还显示了钙离子的位置

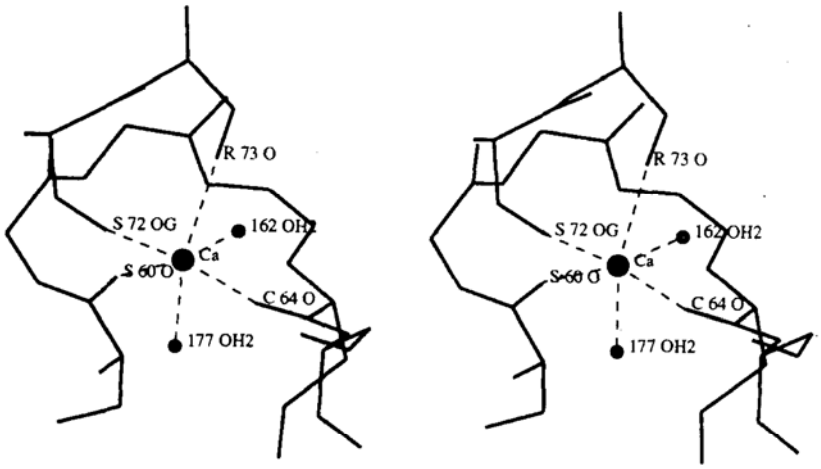

图 2 围绕钙离子的局部结构立体图

显示钙离子及与其配位的 6 个原子集团

是模型 6LYZ 使用了实空间修正方法，精度较低.

共找到 171 个有序水分子，绝大多数水分子与蛋白质或其他水分子形成氢键. 统计数字还表明，蛋白质上的氧同水比氮更容易形成氢键，正如其他研究指出的那样[9]，其中主链上的氧同水形成的氢键是主链上的氮同水形成氢键的 2 倍左右. 更值得注意的是离子结合部位的存在，这在已报道的溶菌酶晶体结构测定中是首次发现. 除了硫原子外，在 $2F_o\text{-}F_c$ 密度图上还有 2 个高于 6.5σ 等值线的密度峰，其中最高的密度峰被辨为金属离子，它以很好的六配位 (4 个蛋白质残基的氧 S60O,C64O,S72OG,R73O 和 2 个水分子的氧 OW162O,OW177O) 形式存在 (图 2)，6 个氧原子和金属离子的距离均在 2.28—2.52Å 之间. 由于结晶溶液中加了 NaCl，开始曾将金属离子作为钠离子进行结构修正，但从配位键长度和峰的高度来看，该金属离子更可能是钙离子. 结合钙离子的初步结论符合迄今测定的蛋白质晶体结构中含钙离子远比钠离子常见的现象，而且也为后来用原子吸收光谱法测定的结果所证实，用于结晶的溶菌酶样

品和水溶液中都显著含有钙元素．另一个较高的密度峰是开始作为水分子进行结构修正的第161位密度峰，它与N113ND2和相邻的另一个分子Y23OH的距离分别为0.336nm和0.318nm，作为氢键的键长要比一般与氧原子形成的氢键长度长，而是处在已报道的氯离子成氢键的作用范围内[10]，而且该密度峰被当作水修正时，其温度因子明显偏低．因此，该密度峰更宜被解释为氯离子．

蛋白质晶体内分子的有序排列是靠一些分子间非键作用来稳定的，其中包括范德华接触、氢键、盐桥和通过氢键由水分子构成的水桥等．基于我们的溶菌酶晶体结构模型，对晶体学独立的溶菌酶分子与其周围分子的作用做了统计，除了未形成任何盐桥外，蛋白质分子间的氢键和较多数量的范德华接触及水桥对稳定分子包装起着决定性作用．在现晶体结构模里，蛋白质分子间存在着相当数量的有序水桥．这些水桥的表现是多种多样的：有的是以单个水分子来连接2个相邻的蛋白质分子中的2个或多个残基；有的是以2个以上水分子来连接2个蛋白质分子的残基；更多的则是以多个水分子形成网状结构来连接2个以上蛋白质分子中的多个残基．同模型2LYM相比较，与蛋白质结合紧密的水分子所占据的位置基本相同，但联系较弱的水分子，特别是不与蛋白质分子直接结合而只与其它水分子相联系的水分子的配置是有较明显差异的．

用空间生长的溶菌酶单晶体收集的衍射数据，获得了分辨率高达1.6Å的溶菌酶晶体结构，就溶菌酶结构的分辨率来讲，高于1993年4月出版的蛋白质数据库里任何溶菌酶结构的分辨率．在某种意义上，这说明微重力条件有利于生长较好质量的蛋白质晶体，从而利用该手段达到提高测定蛋白质三维结构精度的目的．同一种蛋白质的结构模型的差异与不同的测定精度相关，但客观存在的差异应该是包括重力在内的结晶环境和条件的差异造成的．为了辨认引起上述一些局部结构差异的主要因素，进一步的研究工作正在进行之中．

参　考　文　献

[1] Strynadka, N. C. J., James, M. N. G., *J. Mol. Biol.*, 1991, **220**: 401—424.

[2] 毕汝昌、桂璐璐、师珂等，中国科学，B辑，1993, **23**(12): 1153—1157.

[3] Steinrauf, L. K., *Acta Cryst.*, 1959, **12**: 77.

[4] Diamond, R., *J. Mol. Biol.*, 1974, **82**: 371—393.

[5] Brunger, A. T., Kuriyan, J., Karplus, M., *Science*, 1987, **235**: 458—460.

[6] Jones, T. A., *Methods Enzymol.*, 1985, **115**: 157—170.

[7] Hendrickson, W. A., *Methods Enzymol.*, 1985, **115**: 252—270.

[8] Kundrot, C. E., Richards, F. M., *J. Mol. Biol.*, 1987, **193**: 157—170.

[9] Blake, C. C. F., Pulford, W. C.A., Artymiuk, P. J., *J. Mol. Biol.*, 1983, **167**: 693—723.

[10] Jeffrey, G. A., Maluszynska, H., *Int. J. Biol. Macromol.*, 1982, **4**: 173—185.