

# 与酵母 Ure2p 朊病毒结构域融合表达的 谷胱苷肽-S-转移酶结构的改变\*

李运敏<sup>1</sup> 饶子和<sup>2</sup> 田波<sup>1\*\*</sup>

1. 中国科学院微生物研究所分子病毒与生物工程研究室, 北京 100080; 2. 清华大学结构生物学实验室, 北京 100084

**摘要** 酵母朊蛋白 Ure2 蛋白(Ure2p)具有动物朊蛋白类似的构象转变特点,其 N-端 65 个氨基酸是朊病毒结构域(PrD),对酵母朊病毒的发生起关键性作用. 将 PrD 基因与谷胱苷肽-S-转移酶(GST)基因重组,在大肠杆菌中表达了可溶性的 GST-PrD 融合蛋白(sGST-PrD). sGST-PrD 在体外自发地聚合成纤维,这种蛋白纤维的圆二色谱呈典型的  $\beta$ -折叠,对蛋白酶 K 的抵抗力增加,并具有淀粉样纤维的光学特性. 聚合的 GST-PrD (aGST-PrD)能促进 sGST-PrD 聚合成纤维. 这些结果显示 PrD 能使与其融合的 GST 蛋白的构象发生变化,形成一种新的朊蛋白样嵌合蛋白. 这是 PrD 改变其他蛋白构象的证据.

**关键词** 酵母朊蛋白 Ure2p 朊病毒结构域 谷胱苷肽-S-转移酶 构象

Wickner 用朊病毒理论来解释酵母的 2 种非 Non-Mendelian 遗传表型因子 [PSI<sup>+</sup>] 和 [URE3]<sup>[1]</sup>,认为 Ure2p 和 Sup35p 是酵母的朊蛋白. Ure2p 是酵母氮代谢的调节蛋白,当它的构象发生改变后便相互凝聚形成淀粉样纤维而丧失了调节氮代谢的功能,使酵母具有 [URE3] 表型. Ure2p 的 N-端 65 个氨基酸是朊病毒结构域(PrD),C-端的 66 ~ 354 位氨基酸是调节氮代谢的功能区,[URE3] 表型的出现和维持都需要 PrD 的存在<sup>[2~4]</sup>. Taylor 等<sup>[5]</sup>用合成的 PrD 蛋白在体外形成了纤维,聚合 PrD 的  $\beta$ -折叠含量增加,而且 PrD 能特异地诱导 Ure2p 形成纤维样聚合物,并抵抗蛋白酶 K 的消化. Thual 等<sup>[6]</sup>在大肠杆菌里表达并纯化的 Ure2p 能形成淀粉样纤维,并能部分抵抗蛋白酶的消化. 缺失了 PrD 的 Ure2p 不能形成淀粉样纤维,并保持正常的氮代谢调节功能,表明 PrD 在酵母朊蛋白 Ure2p 的形成中起重要作用.

我们将 Ure2p 的 PrD 与谷胱苷肽-S-转移酶(GST)融合,在大肠杆菌里表达了可溶性的 GST-PrD(sGST-PrD). 纯化的 sGST-PrD 能形成淀粉样纤维,它的  $\beta$ -折叠含量增加,能部分抵抗蛋白酶 K 的消化,有双折光性. 在 sGST-PrD 溶液里加入聚合的 GST-PrD 作为种子,可以促进 sGST-PrD 形成聚合物. 研究表明 PrD 改变蛋白的构象的能力并不仅限于 Ure2p,也引起了与其融合的 GST 的构象发生改变.

2000-12-21 收稿,2001-02-20 收修改稿

\* 国家重点基础研究发展规划资助项目(批准号: G1999075602)和国家农业部“九四八”项目(批准号:982078)

\*\* 联系人, E-mail: tienpo@sun.im.ac.cn

## 1 材料与方法

(1) *Ure2pPrD* 基因的克隆及表达载体构建. 根据 *Ure2* 基因序列<sup>[7]</sup> 设计引物 (5'-GGGGATCCCATATGATGAATAACAACGGC 和 5'-GGGAATTCATTAGCGG CCGCTGTTATTG), 从具有 [URE3] 表型的啤酒酵母中提取总 DNA, 按下列条件进行 PCR 反应: 94℃, 3 min; 94℃, 50 s; 50℃, 50 s; 72℃, 50 s; 25 个循环. 将扩增出的约 214 bp 的 *PrD* 基因片段与 pGEM-T 载体 (Promega) 连接形成重组质粒 pT-*PrD*. 用 *Bam*H I / *Eco*R I 将 *PrD* 基因从 pT-*PrD* 切出, 并与用同样酶消化的含 *GST* 基因的 pGEX-6p-1 (Amersham Pharmacia) 质粒连接, 构建成 *GST* 融合蛋白表达载体 pGEX-*PrD*.

(2) *GST-PrD* 融合蛋白的表达和纯化. 将 pGEX-*PrD* 质粒转化 *E. coli* BL21(DE3), 经异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达了可溶性的融合蛋白 *GST-PrD*. 菌体重悬于 PBS 中, 经超声裂解, 按使用说明用谷胱甘肽琼脂糖 4B 凝胶 (Amersham Pharmacia) 亲和层析纯化 *GST-PrD* 蛋白, SDS-PAGE 鉴定融合蛋白的大小及纯度. 纯化的 *GST-PrD* 对缓冲液 I (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA) 进行透析, 蛋白浓度用 BIO-RAD 蛋白分析试剂测定. 用 PreScission 蛋白酶 (Amersham Pharmacia) 从 *GST-PrD* 融合蛋白切下 *PrD*, 酶切产物经 BioCAD 灌注色谱系统和 POROS R2 反相层析柱 (PerSeptive Biosystems, Inc.) 进行分离纯化, 溶液 A 为含 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 的水溶液, 溶液 B 为含 0.09% TFA 的乙腈溶液, 流速为 3 mL/min, 梯度洗脱条件为 0% ~ 65% 溶液 B 洗脱 65 mL, Tricine/SDS-PAGE 检测纯化效果.

(3) 电子显微镜观察. 分别取 5  $\mu$ L *PrD* 和 a*GST-PrD* 样品, 滴于喷过碳的铜网上, 用去离子水洗 2 次, 2% 乙酸铀染色 30 s, 再用去离子水洗 2 次, 空气干燥. 在日立 H600A 电子显微镜下观察聚合物的形态.

(4) 圆二色谱测定. 用缓冲液 II (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0, 10 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA) 将 *PrD*, *GST*, s*GST-PrD* 和聚合的 *GST-PrD* (a*GST-PrD*) 稀释至 200  $\mu$ g/mL. 扫描前分别将样品进行超声处理. 用 JASCO 715 圆二色谱仪进行远紫外光谱分析, 扫描范围为 190 ~ 250 nm.

(5) 刚果红染色. 8000 g 离心沉淀 *PrD* 纤维和 a*GST-PrD* 纤维, 用缓冲液 I 洗涤 2 次, 加入 0.1 体积的 2% 刚果红, 室温染色 1 h. 8000 g 离心 30 s, 沉淀用 500  $\mu$ L 去离子水洗涤 2 次, 重悬于 100  $\mu$ L H<sub>2</sub>O 中, 涂于载玻片上. 干燥后用 90% 乙醇洗涤以除去多余的刚果红. 在 Olympus BH2 偏振光显微镜下观察.

(6) 蛋白酶 K 消化. 用缓冲液 I 将 *GST*, s*GST-PrD*, a*GST-PrD* 和 *PrD* 的蛋白浓度调整为 1 mg/mL, 加入终浓度为 20  $\mu$ g/mL 的蛋白酶 K, 在 37℃ 进行反应. 分别在 0, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240 min 取 20  $\mu$ L 样品, 立即加入含 5 mmol/L 苯甲磺酰氟 (PMSF) 的上样缓冲液, 置于沸水浴中 3 ~ 5 min, 用 Tricine/SDS-PAGE 检测消化情况.

(7) 种子试验. 在 s*GST-PrD* 溶液里分别加入 1% *PrD* 和 a*GST-PrD* 纤维, 室温放置 24 h, 15000 g 离心弃上清, 沉淀加入 20  $\mu$ L 上样缓冲液, 于沸水浴 3 ~ 5 min, 经 SDS-PAGE 观察聚合蛋白的量.

## 2 结果

### 2.1 GST-PrD 融合蛋白的表达和纯化

克隆的 *PrD* 基因片段,经序列测定与已报道的<sup>[7]</sup>的完全相同.将 *PrD* 基因片段插入到 pGEX-6P-1 质粒,构建成融合表达载体 pGEX-PrD,在 *E. coli* BL21 (DE3)里表达了可溶性的融合蛋白 GST-PrD.经谷胱甘肽琼脂糖 4B 亲和层析纯化,得到纯度为 90%左右的 GST-PrD(图 1).GST-PrD 经 PreScission 蛋白酶切割后,用反相层析柱 POROS R2 纯化,收集含 PrD 蛋白的洗脱峰,得到纯化的 PrD 蛋白(图 2).对聚合后的 GST-PrD 蛋白进行酶切,结果表明 PreScission 蛋白酶不能将 PrD 从融合蛋白上切下来.

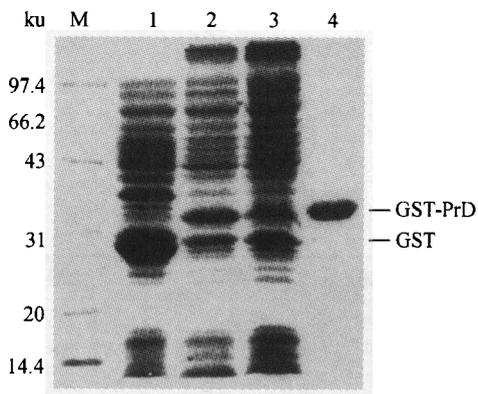


图 1 GST-PrD 融合蛋白的表达及纯化

M 为蛋白分子量标准;1 为 pGEX-6P-1 转化的 BL21;2 为 pGEX-PrD 转化的 BL21 的菌体;3 为超声后的上清液;4 为从谷胱甘肽琼脂糖 4B 亲和层析洗脱的 GST-PrD

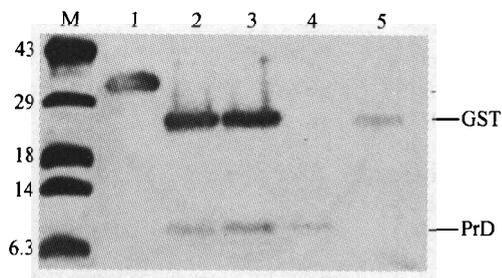


图 2 GST-PrD 融合蛋白的酶切及 PrD 的反相纯化

1 为纯化的 GST-PrD;2,3 为 PreScission 酶切后 GST-PrD;4 为从反相柱洗脱的 PrD;5 为从反相柱洗脱的 GST

### 2.2 GST-PrD 融合蛋白的凝聚和纤维化

将 sGST-PrD 进行浓缩换液后,在浓度低于 4 mg/mL 时,它仍是可溶状态,当浓缩至 4 mg/mL 以上时,便很快凝聚形成聚合物.浓度低于 4 mg/mL 的 sGST-PrD 融合蛋白溶液在 4℃ 放置 24 h 以上,也形成纤维状聚合物.PrD 在相同条件下更容易形成聚合物;GST 溶液及 GST 与 PrD 混合溶液,在相同的条件下没有聚合物形成.

### 2.3 GST-PrD 融合蛋白聚合物形态

在透射电子显微镜下观察,PrD 的聚合物和 GST-PrD 聚合物都表现为纤维状,PrD 形成的纤维直径为 6~15 nm,长度为 100~500 nm.GST-PrD 形成的纤维直径为 10~20 nm,长度为 100~300 nm(图 3),而且有不规则的纤维团块存在(结果未显示).

### 2.4 GST-PrD 融合蛋白的圆二色谱

根据文献<sup>[8]</sup>的方法计算蛋白的二级结构含量.GST 和 sGST-PrD 蛋白的圆二色谱都有明显的  $\alpha$ -螺旋特征,在 208 nm 和 222 nm 处有双负峰.而 PrD 和 aGST-PrD 在 208 nm 处的峰消失,在 215 nm 有一负峰,提示  $\beta$ -折叠含量上升.这些结果表明 GST-PrD 蛋白在聚合过程中的构象发生了改变, $\beta$ -折叠的含量增加(图 4,表 1).

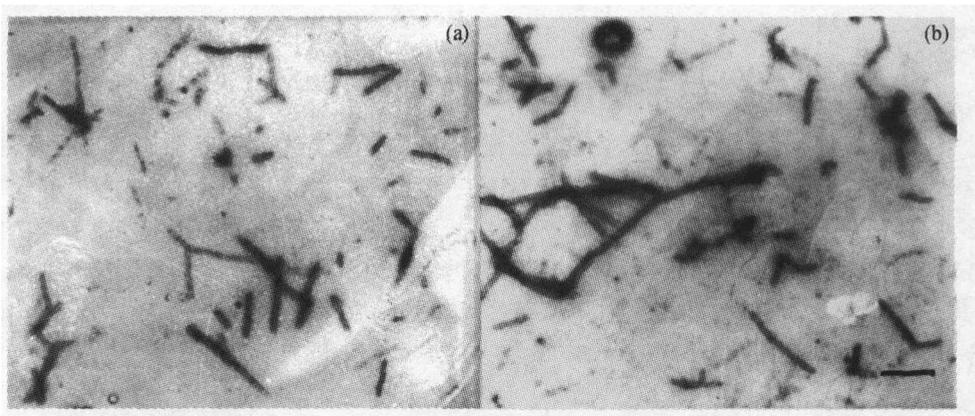


图 3 电子显微镜下观察的 GST-PrD 纤维

(a) GST-PrD 形成的蛋白纤维; (b) PrD 形成的蛋白纤维. 标尺为 100 nm

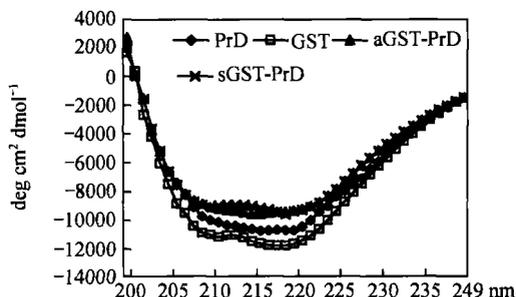


图 4 GST-PrD 的圆二色性图谱

表 1 用 CD 估算的二级结构含量 (%)

|          | $\alpha$ -螺旋 | $\beta$ -折叠 | 转角 | 无规卷曲 |
|----------|--------------|-------------|----|------|
| PrD 纤维   | 16           | 43          | 14 | 27   |
| GST      | 42           | 15          | 20 | 13   |
| sGST-PrD | 30           | 26          | 24 | 17   |
| aGST-PrD | 24           | 40          | 17 | 19   |

## 2.5 刚果红染色的 GST-PrD 融合蛋白凝聚物的双折光性

将 PrD 聚合物和 GST-PrD 聚合物用缓冲液 I 洗涤, 2% 刚果红染色. 在偏振光显微镜的亮视野里可以观察到许多红色的凝聚物, 在暗视野下表现为黄-绿双折光性, 表明 PrD 和 GST-PrD 聚合物都是淀粉样纤维, 含有规则的二级结构(图版 I).

## 2.6 GST-PrD 融合蛋白对蛋白酶 K 的抵抗力

在 1 mg/mL 的 GST-PrD 蛋白溶液里加入终浓度为 20  $\mu$ g/mL 的蛋白酶 K, 于 37 $^{\circ}$ C 消化 1 h. 经 Tricine/SDS-PAGE 结果显示 GST 在 15 min 后就被完全消化; sGST-PrD 和 aGST-PrD 分别在 120 和 240 min 被完全消化; PrD 纤维在 240 min 时仍能检测到 PrD 蛋白的存在, 说明 PrD 纤维对蛋白酶 K 有较强的抵抗力, aGST-PrD 纤维也具有抵抗蛋白酶 K 消化的能力. 而且比较 sGST-PrD 和 aGST-PrD 的电泳图谱可发现 aGST-PrD 经蛋白酶 K 消化后, GST 蛋白带直到 60 min 才消失, 而 sGST-PrD 在消化 5 min 后 GST 蛋白带就消失了(图 5).

## 2.7 GST-PrD 融合蛋白聚合自促进作用

在 sGST-PrD 溶液 (1 mg/mL) 里加入 1% aGST-PrD 纤维或 PrD 纤维, 室温放置 24 h 后, Tricine/SDS-PAGE 结果显示加入的 aGST-PrD 纤维使 sGST-PrD 产生的聚合物的量增加, 远大于未加 aGST-PrD 纤维的或 PrD 纤维的 sGST-PrD 产生聚合物的量(图 6).

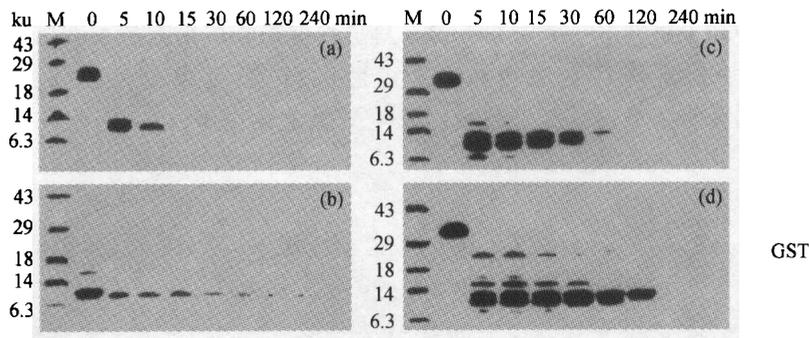


图5 GST-PrD 纤维的蛋白酶 K 抵抗能力  
(a) GST; (b) PrD 纤维; (c) sGST-PrD; (d) aGST-PrD

### 3 讨论

酵母朊蛋白是研究朊蛋白构象变化的重要模型,通过对酵母朊蛋白的研究可以获得从哺乳动物朊蛋白不易得到的信息.在酵母朊蛋白研究中发现朊病毒结构域(PrD)对朊病毒的发生起关键作用<sup>[1]</sup>,而在动物朊蛋白中还没发现类似的结构域.为了进一步阐明朊病毒结构域的作用,我们将 PrD 基因与 GST 基因重组,在 *E. coli* 里表达了可溶性的 GST-PrD 融合蛋白.纯化的 GST-PrD 融合蛋白在体外具有朊蛋白的结构特点.通过电子显微镜和偏振光显微镜观察, GST-PrD 形成了纤维样的聚合物,具有双折光性,表明它是淀粉样纤维,含有规则的二级结构.蛋白酶 K 消化结果表明 sGST-PrD 有部分抵抗蛋白酶 K 消化的能力,而 aGST-PrD 蛋白具有较强的抗蛋白酶 K 消化的能力,而且其中的 GST 蛋白带存在时间远超过 sGST-PrD 中的 GST,暗示 GST 的构象发生了改变.圆二色谱表明 aGST-PrD 的  $\beta$ -折叠含量(40%)高于 sGST-PrD (26%)和 GST (15%).在 sGST-PrD 溶液里加入 PrD 或 aGST-PrD 纤维,增加了 sGST-PrD 变成淀粉样纤维聚合物的量,说明 PrD 或 aGST-PrD 能促进 sGST-PrD 蛋白的聚合,这符合哺乳动物朊蛋白结构转换的“种子”模型<sup>[9]</sup>.

用蛋白酶 K 消化 aGST-PrD 融合蛋白的结果表明整个蛋白都对蛋白酶 K 有抵抗力,而且 GST 的存在时间延长.用 PreScission 蛋白酶切割 GST-PrD 融合蛋白, aGST-PrD 能完全抵抗 PreScission 蛋白酶切割,表明融合蛋白的切点不能为 PreScission 蛋白酶接近,说明构象发生了变化. sGST-PrD 和 aGST-PrD 的圆二色谱结果表明融合蛋白中 GST 部分的  $\beta$ -折叠含量上升,这是由 PrD 引起并扩展到 GST 部分.这些结果表明 GST-PrD 融合蛋白中 GST 的结构发生了变化.

Li 等<sup>[10]</sup>将酵母朊蛋白 Sup35p 的朊病毒结构域与鼠糖皮质激素受体基因融合,该嵌合蛋

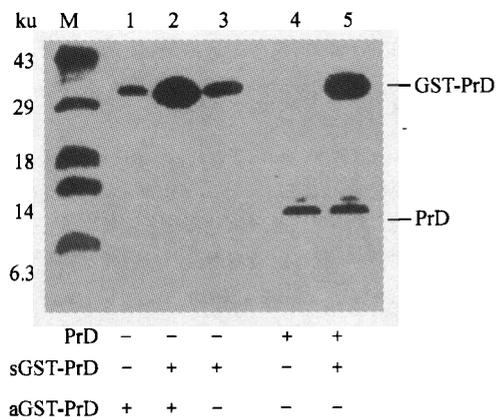
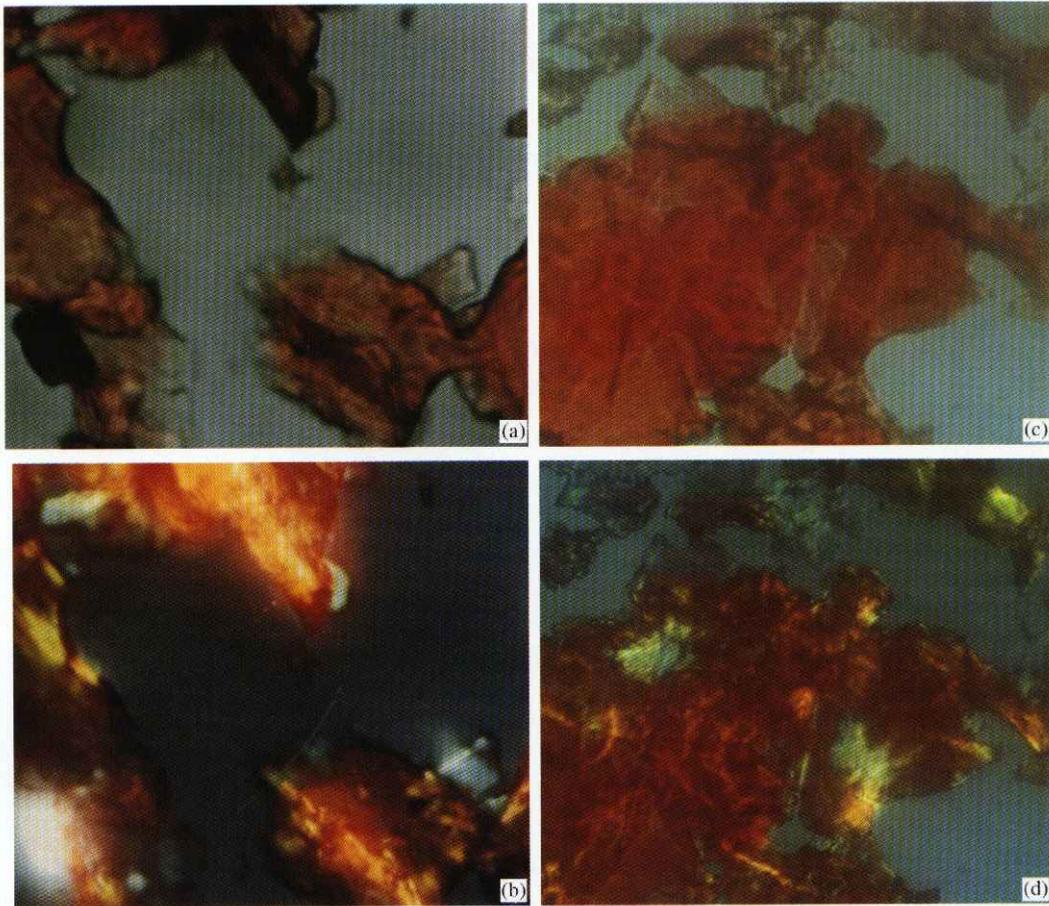


图6 自促进形成 GST-PrD 纤维的电泳  
-表示不含该样品; +表示含有该样品

白在酵母细胞内表现朊蛋白样蛋白的特点,改变了糖皮质激素受体的构象和功能. 而融合蛋白 GST-PrD 的特点表明 PrD 改变了 GST 的构象. 最近根据动物朊蛋白的 N-端八肽重复区和酵母朊蛋白的 N-端的 PrD 富含谷氨酰胺和天冬酰胺的特点,发现了一种新的酵母朊蛋白 Rnq1<sup>[11]</sup>,这些结果都表明了 PrD 对酵母朊蛋白发生的决定性作用,也表明朊病毒结构域能引起与其融合的其他蛋白的构象发生变化.

### 参 考 文 献

- 1 Wickner R B. [URE3] as an altered URE2 protein: Evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 1994, 264: 566
- 2 Masison D C, et al. Prion-inducing domain of yeast Ure2p and protease resistance of Ure2p in prion-containing cells. *Science*, 1995, 270: 93
- 3 Kushnirov V V, et al. Structure and replication of yeast prions. *Cell*, 1998, 94: 13
- 4 Tuite M F. Yeast prions and their prion-forming domain. *Cell*, 2000, 100: 289
- 5 Taylor K, et al. Prion domain initiation of amyloid formation *in vitro* from native Ure2p. *Science*, 1999, 283: 1339
- 6 Thual C, et al. Structural characterization of *Saccharomyces cerevisiae* prion-like protein Ure2. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274: 13666
- 7 Co-Schigano P W, et al. The Ure2 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* plays an important role in the cellular response to the nitrogen source and has homology to glutathione S-transferases. *Molecular and Cellular Biology*, 1991, 11: 822
- 8 鲁子贤, 等编著. 圆二色性和旋光色散在分子生物学中的应用. 北京: 科学出版社, 1987
- 9 韩生成, 等. 朊蛋白的基因及其蛋白质结构生物学的研究. *科学通报*, 1998, 43(19): 2017
- 10 Li L M, et al. Creating a protein-based element of inheritance. *Science*, 2000, 287: 661
- 11 Sondheimer N, et al. Rng 1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Mol Cell*, 2000, 5(1): 163



用偏振光显微镜观察经刚果红染色的 PrD 和 GST-PrD 聚合物  
(a),(c)分别为在亮视野下观察到的 PrD 和 GST-PrD 红色聚合物;(b),(d)分别为在暗视野下观察到的 PrD 和 GST-PrD 聚合物,有双折光性。