

大肠杆菌二硫键形成蛋白 A (DsbA) 研究进展

Study on Disulfide Bond Formation Protein A in *Escherichia coli*

罗 曼, 关怡新*, 姚善泾

LUO Man, GUAN Yi-Xin* and YAO Shan-Jing

浙江大学化学工程与生物工程学系 杭州 310027

Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China

摘 要 二硫键形成蛋白 A (Disulfide bond formation protein A, DsbA) 是存在于大肠杆菌周质腔内的一种参与新生蛋白质折叠过程中催化二硫键形成的折叠酶。综述了 DsbA 三维结构、进化过程、协助蛋白质体内外复性方面的研究进展。DsbA 比硫氧还原蛋白具有更强的氧化性, 其强氧化性来自于 Cys³⁰ 残基异常低的 pK_a 值和不稳定的氧化型结构。通过定点突变的研究表明了 Cys³⁰ 残基是 DsbA 活性中心最关键的氨基酸残基之一。DsbA 不论在体内与目标蛋白融合表达还是在体外以折叠酶形式添加, 都能有效地催化蛋白质的折叠复性, 同时 DsbA 还具有部分分子伴侣的活性。

关键词 DsbA, Dsb 家族, 折叠酶, 蛋白质折叠

中图分类号 Q7 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)01-0007-09

Abstract Disulfide bond formation protein A, DsbA, is one of the important proteins located in *E. coli* periplasm, which is a foldase facilitating the folding of nascent secreted proteins, especially for those with many pairs of disulfide bonds. The crystal structure and phylogenetic analysis of DsbA and DsbA-mediated protein folding, alternatively *in vivo* and *in vitro*, are summarized. Both the extremely low pK_a of Cys³⁰, about 3.5, and the destabilizing effect of the active site disulfide contribute to its strong oxidizing power. The Cys³⁰ is also considered as the most important residue closely related to its activity using site-directed mutagenesis methodology. DsbA could effectively assist proteins folding, both *in vivo* coexpressed with the target protein, and *in vitro* replenished as foldases. Moreover, DsbA also has the chaperone-like activity in the assistant refolding of genetically engineered inclusion bodies.

Key words DsbA, Dsb family, foldase, protein folding

在生命科学领域, 蛋白质的折叠过程及机理研究一直是研究者们关注的焦点之一。蛋白质的折叠通常经历以下几个步骤^[1] (1) α 螺旋与 β 股形成; (2) 由相邻的 β 股形成反平行的 β 折叠片结构; (3) 由 α 螺旋与 β 折叠等二级结构组装形成三级结构; (4) 二硫键形成; (5) 平行的 β 结构形成。其中二硫

键的形成则与蛋白质能否折叠成稳定的三级结构和立体空间构象有着密切的关系, 特别是在某些含有多个肽链或亚基的蛋白质中, 如胰岛素, 二硫键在其能否折叠和组装成为具有生物学活性的结构, 并稳定这种结构的过程中起了关键性的作用^[2]。

一般而言, 生物体内新生肽链中的二硫键是在

Received: August 10, 2006; Accepted: October 19, 2006

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 20476093).

* Corresponding author. Tel: +86-571-87951982; Fax: +86-571-87951015; E-mail: guanyx@zju.edu.cn

国家自然科学基金资助项目(No. 20476093)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

转录后形成的,它通过降低非折叠态的熵从而稳定折叠态的构象^[3]。通常,二硫键是在 α 螺旋与 β 折叠的形成完成后选择性氧化半胱氨酸形成的,并不是邻近的半胱氨酸就会形成天然蛋白质构象所需的正确配对的二硫键^[1],因此如何才能保证形成非错配的二硫键则成为蛋白质折叠中最后但也是最关键的步骤。除此之外,无论在生物体内还是体外进行的蛋白质折叠,二硫键的氧化形成都是折叠过程中的一大限速步骤,如果能有效提高正确配对的二硫键的形成速度,就能大大提高蛋白质折叠的效率。在大肠杆菌分泌蛋白的表达过程中,一类折叠酶(foldases)——Dsb家族蛋白质——的参与大大提高了新生肽链的折叠速率,从而使得大肠杆菌能保证使正常所需的新生多肽链能够及时并正确地折叠。

本文主要综述了Dsb家族中DsbA的结构、性质、功能以及其在体内外协助蛋白质复性的研究进展。

1 DsbA及Dsb家族简介

1.1 DsbA的发现

DsbA最早是由Beckwith等^[4]于1991年发现的,他们观察到 $dsbA$ 的基因突变株会造成大肠杆菌二硫键的严重缺乏,在这些突变株中,标记过的 β -内酰胺酶、碱性磷酸酯酶以及细胞外膜蛋白(Ac OmpA)分泌表达但是二硫键大量缺失。此外,他们还克隆了 $dsbA$ 基因,并发现纯化的DsbA蛋白能还原胰岛素中的二硫键,因此推测其在体内能够协助新生肽折叠时二硫键的形成。

Ito等^[5]于1992年也发现了在 $ppfA$ 基因的突变株中,碱性磷酸酯酶异常表达,不能正常分泌到周质胞腔中。同时,他们克隆了 $ppfA$ 基因,还注意到其编码的蛋白同Beckwith等发现的 $dsbA$ 基因编码的蛋白同样都包含一个潜在的氧化还原活性中心:Cys-Pro-His-Cys,因此推测 $ppfA$ 与 $dsbA$ 为同一基因。

直到1993年,Frederick等^[6]获得了大肠杆菌K-12从 $rrnA$ 基因到 $katG$ 基因之间的基因谱图, $ppfA$ 与 $dsbA$ 才被确认为位于该谱图的5059~5685之间的同一基因。

1.2 Dsb家族概况

继DsbA被发现以后,其催化体内蛋白质二硫键形成的功能受到很多科学家的重视,Dsb家族中的其他成员如DsbB、DsbC、DsbD、DsbE、DsbG被相继发现。Dsb家族中的6个成员蛋白都与硫氧还原蛋白(thioredoxin)以及二硫键异构酶(PDI)一样,具有一个相似的包括有两个半胱氨酸以CXXC形式存在

的活性中心,不同的成员两个半胱氨酸之间的氨基酸有所不同。

在Dsb家族的6个成员中,DsbB、DsbD、DsbE均为膜蛋白,其他三者都存在于大肠杆菌的周质胞腔中。DsbA的主要功能就是氧化新生肽链上的巯基形成二硫键,DsbC和DsbG起着二硫键异构酶的作用,使错配的二硫键重新配对,DsbB和DsbD分别再生DsbA和DsbC,DsbE则参与细胞色素c的合成。

2 DsbA的结构及其性质

一般来说,蛋白质中的二硫键并不是在其被合成的细胞器中形成的^[7],在真核细胞中,二硫键一般在内质网上形成。对于大肠杆菌,其表达的蛋白质既有胞内蛋白也有分泌蛋白,对于胞内蛋白通常在胞内由分子伴侣,如HSP60、HSP70分子伴侣系统等,介导新生肽折叠成正确的三维构象,使之行使正常的生理功能。但是对于分泌蛋白而言,如果在胞内完成折叠,由于空间位阻等方面的影响,将会使之很难顺利分泌到胞外,因此,这些分泌蛋白的折叠过程通常是在周质胞腔中完成的,Dsb家族蛋白正是在帮助这些新生肽链进行折叠形成正确配对的二硫键的过程中必不可少的折叠酶。

2.1 DsbA的蛋白序列及结构

DsbA是Dsb家族中第一个被发现的蛋白质,它存在于大肠杆菌的周质胞腔中,由208个氨基酸组成,其中C端有一个包含19个氨基酸的信号肽,分子量为23.1kD(不含信号肽为21.1kD),等电点为5.95,其活性中心为Cys³⁰-Pro³¹-His³²-Cys³³,其中Cys³³包埋于蛋白内部,Cys³⁰暴露于蛋白表面,隶属于硫氧还原蛋白超家族下的Dsb家族。

人们已经解析出氧化型^[8,9]和还原型^[10]DsbA的三维晶体结构,图1为氧化型和还原型的DsbA与其活性中心,以及硫氧还原蛋白的对照三维结构图。从图中不难看出,DsbA由6个 α 螺旋与5个 β 折叠构成,并组成了由柔韧的链结构——IV型的 β 转角(Phe⁶³-Met⁶⁴-Gly⁶⁵-Gly⁶⁶)联结起来的两个独立的结构域,其中一个结构域具有类似硫氧还原蛋白的折叠结构——硫氧还原蛋白结构域,另一个结构域紧凑地折叠成螺旋状插入到硫氧还原蛋白结构域中^[10],亦称为 α 螺旋结构域。DsbA的活性中心CPHC位于N-末端的第一个 α 螺旋中,包含于硫氧还原蛋白结构域中。值得指出的是,DsbA中的硫氧还原蛋白结构域在一级结构上是不连续的,它的氨基端和羧基端各有一段序列参与硫氧还原蛋白结构域的形成

(1-62 以及 139-189 残基), 其中间一段插入的序列形成了 α 螺旋结构域。另外, 氧化型与还原型 DsbA

的构象在整体上并无大的区别, 仅仅是 Pro³¹ 与 His³² 侧链的空间位置有些许改变。

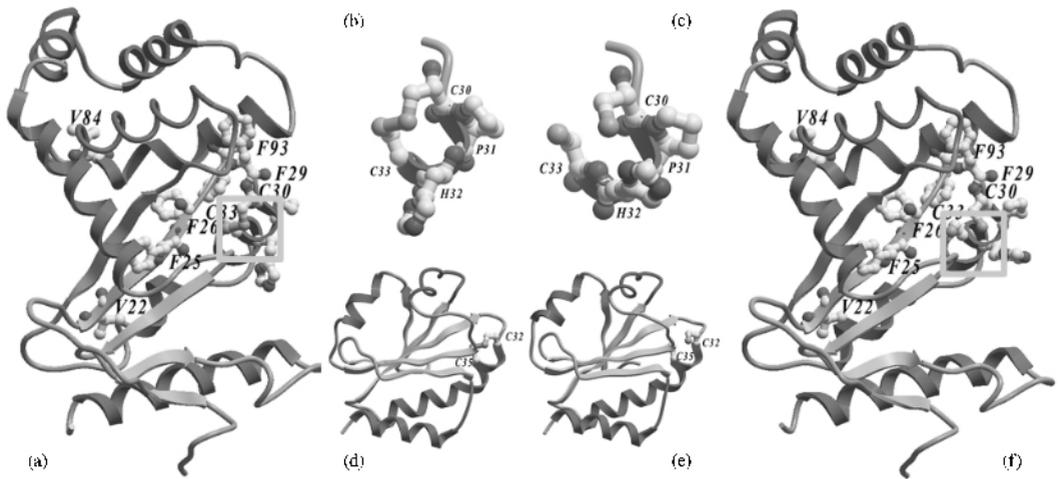


图 1 DsbA 及其活性中心和硫氧还原蛋白的三维结构图

DsbA 的 α 螺旋结构域和硫氧还原蛋白结构域由一个柔性的铰链 Phe⁶³-Met⁶⁴-Gly⁶⁵-Gly⁶⁶ 连接(见图中蓝色部分)。

Fig. 1 The structure of DsbA, its active site and thioredoxin.

The two domains of DsbA, the helical and thioredoxin domain, are connected by a flexible hinge,

Phe⁶³-Met⁶⁴-Gly⁶⁵-Gly⁶⁶, shown as blue ribbon in the figure.

(a) The structure of oxidized DsbA; (b) the detailed structure of oxidized DsbA active site; (c) the detailed structure of reduced DsbA active site; (d) the structure of oxidized thioredoxin; (e) the structure of reduced thioredoxin; (f) the structure of reduced DsbA.

图 2 给出的是大肠杆菌体内的 DsbA 和硫氧还原蛋白以及其他一些动植物体内的 PDI 等蛋白的序列用 ClustalX^[11] 进行多序列比对(multiple sequence alignment, MSA) 得到的结果。研究发现, 它们都具有共同的 CXXC 活性中心结构, 二硫键的氧化形成和还原异构的过程, 正是通过这些活性中心与目标蛋白的巯基或二硫键之间进行巯基-二硫键交换反应实现的。

除了 CXXC 的活性中心以外, 在多序列比对图中, 不难发现还有一些高度保守的序列, 它们在很多物种中都是高度保守的, 如大肠杆菌 DsbA 中的 Val²²、Phe²⁵、Phe²⁶、Phe²⁹、Val⁸⁴ 与 Phe⁹³ 等, 在图 1 中, 这些高度保守的序列以位点球棍模型的形式给出, Val 与 Phe 以及比对中的其他蛋白里的 Trp 和 Tyr 均为强疏水性的氨基酸残基, 它们的高度保守不仅和稳定蛋白质的三级结构有关, 更有可能与其折叠酶的活性有着密切的关系——Phe²⁵、Phe²⁶、Phe²⁹ 所在的区域形成了一个大面积的疏水性区域, 很有可能成为一些蛋白质与 DsbA 进行疏水结合的位点。

选取更多的 PDI 相关蛋白质序列进行多序列比对, 采用 NJ 算法(neighbour-joining)^[12] 构建了系统进化树如图 3 所示。

2.2 DsbA 的性质

在 DsbA 发现初期, 研究工作主要集中在对其物

化性质方面的研究, 特别是通过热力学、定点突变、荧光光谱等方法对 DsbA 的构象、性质等方面进行研究, 比较了氧化型与还原型 DsbA 各方面的性质。

Glockshuber 等^[13] 采用荧光滴定的方法, 测得 DsbA 在 pH7.0 下同 GSH 和 GSSG 的平衡常数为 1.2×10^{-4} M, 标准氧化还原势 E'_0 为 -0.089 V。这表明 DsbA 比细胞质中的硫氧还原蛋白具有更强的氧化性, 并和真核生物中的二硫键异构酶(PDI)类似。

Glockshuber 等^[14] 测得还原型和氧化型 DsbA 的沉降系数 $s_{20,w}^0$ 分别为 2.1 ± 0.1 S 和 2.1 ± 0.2 S。他们用盐酸胍考察了 DsbA 的变复性情况, 发现还原型的 DsbA 远比氧化型的稳定, 其变复性的中间点盐酸胍浓度分别为 2.14 mol/L 和 1.66 mol/L。进一步地, 将 DsbA 的变性曲线通过线性外推到 0 mol/L 盐酸胍, 计算出了还原型与氧化型 DsbA 的稳定能分别为 -48.3 ± 2.8 kJ/mol 和 -33.5 ± 1.2 kJ/mol (30°C), 天然态的还原型与氧化型 DsbA 之间的自由能差为 22.7 ± 4.0 kJ/mol, 因而, 分子内的二硫键稳定了氧化型 DsbA 这种能量上不利的紧张态构象, 即一般二硫键的存在是稳定蛋白质的构象, 但是二硫键的存在却使得折叠态的 DsbA 变得不稳定, 即还原型的 DsbA 远比氧化型的稳定, 这与 Creighton 等^[15] 氧化还原滴定以及动力学分析得到的结论不谋而合。

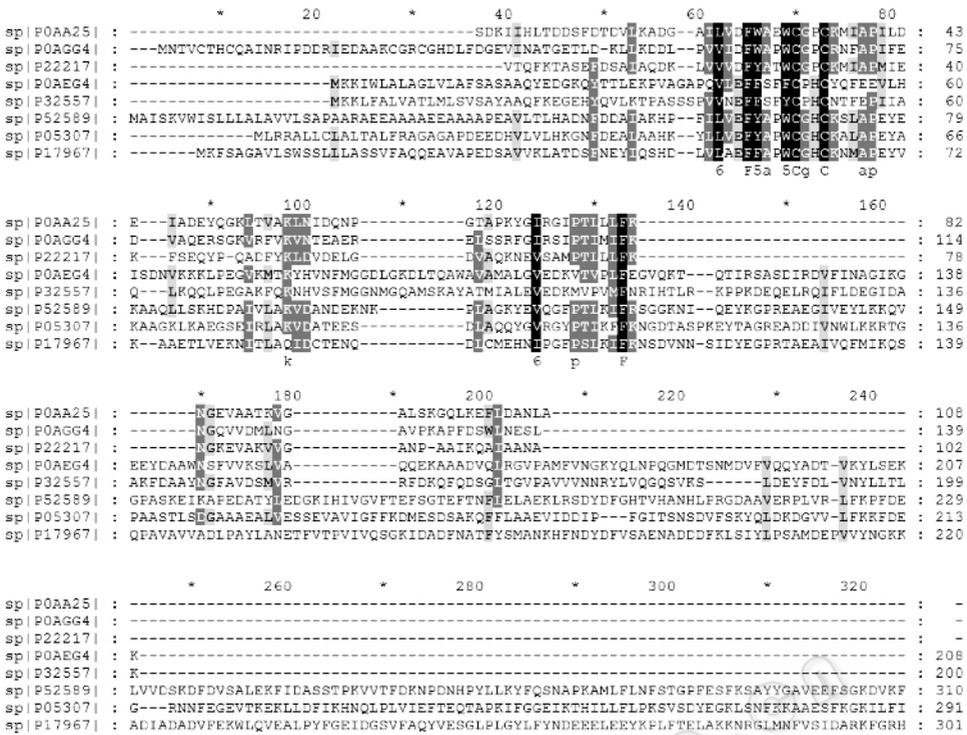


图2 多种 DsbA 同源蛋白的多序列比对, 其中 P0AA25 为大肠杆菌硫氧还原蛋白 I (trxA); P0AGG4 为大肠杆菌硫氧还原蛋白 α (trxC); P22217 为酵母硫氧还原蛋白 I (TRX1); P0AEG4 为大肠杆菌 DsbA (dsbA); P32557 为 *Vibrio cholerae* DsbA (tcpG); P52589 为 *Triticum aestivum* PDI (PDI); P05307 为 *Bos taurus* PDIA1 f (P4HB); P17967 为酵母 PDI (PDII)。由于 DsbA 序列较短, 因而 P52589, P05307 和 P17967 部分序列未给出

Fig.2 The multiple sequence alignment of several homologs of DsbA generated by ClustalX, where P0AA25 for thioredoxin 1 from *Escherichia coli* (trxA); P0AGG4 for thioredoxin 2 from *Escherichia coli* (trxC); P22217 for thioredoxin I from *Saccharomyces cerevisiae* (TRX1); P0AEG4 for DsbA from *Escherichia coli* (dsbA); P32557 for DsbA from *Vibrio cholerae* (tcpG); P52589 for PDI from *Triticum aestivum* (PDI); P05307 for PDIA1 from *Bos taurus* (P4HB); P17967 for PDI from *Saccharomyces cerevisiae* (PDII). The undisplayed sequences of P52589, P05307 and P17967 are omitted because of the ending of the *E. coli* DsbA sequence

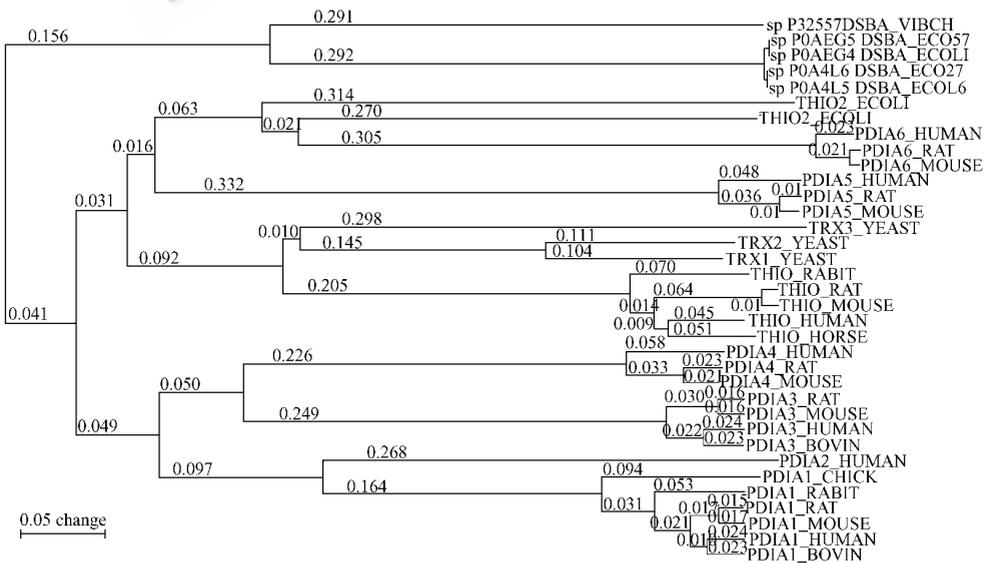


图3 DsbA 的进化分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of DsbA

Phylogenetic tree was constructed from the multiple sequence analysis by ClustalX and visualized by NJPlot using neighbour-joining method. The Swiss-Protein ID was used to identify each protein. The digit on each branch denotes the average number of substitution events per site.

Glockshuber 等^[16]发现还原型的 DsbA 发射的色氨酸荧光要比氧化型的高出 3 倍多,但是 DsbA 序列中仅有的两个色氨酸残基 Trp⁷⁶和 Trp¹²⁶并不存在于硫氧还原蛋白结构域中,而是位于 α 螺旋结构域中。他们考察了突变子 W76F、W126F,发现在还原型和氧化型 W76F 突变子中都根本检测不到色氨酸荧光,而对于野生型的 Trp¹²⁶其荧光也全部淬灭,说明了 Trp⁷⁶是 DsbA 中唯一发射色氨酸荧光的残基。此外,对突变子 W76F、F26L 的热力学稳定性分析证明了 Trp⁷⁶和 Trp¹²⁶之间的结构域间的相互作用相当大程度上保证了 DsbA 的整体稳定性并选择性地稳定了氧化型的 DsbA。

Moutiez 等^[17]通过限制性酶切同质谱相结合的手段研究了还原型、氧化型以及 PID 多肽(DsbB 的部分肽链)结合时 3 种代表形态的 DsbA 的结构,发现酶切位点的数量由多到少依次为氧化型 DsbA、DsbA-PID 结合物、还原型 DsbA,该现象说明了氧化型 DsbA 比还原型更具活动性,因而氧化型的 DsbA 更易同还原型的错配二硫键底物蛋白结合,同时还还原型的 DsbA 刚性的增加使之容易与其氧化产物分离。

DsbA 作为一种酶,研究的最多的当然是其活性中心,人们采用了各种手段,鉴定了 DsbA 的活性中心-CPHC-各个残基的功能及性质。

Creighton 等^[18]采用定点突变的方法,将 Cys³⁰和/或 Cys³³突变为 Ser,确定了 Cys³³是两个半胱氨酸中包埋于 DsbA 三维结构内部且不能与巯基试剂反应的残基,而 Cys³⁰则暴露于 DsbA 蛋白表面,能同谷胱甘肽等形成非常不稳定的混合二硫键结合物的位点。此外,Cys³⁰在稳定折叠态的 DsbA 的结构中起到了相当重要的作用。他们^[21]还测定了 Cys³⁰和 Cys³³残基的 pK_a 值,发现 Cys³⁰拥有特别低的 pK_a 值(约 3.5),在生理 pH 条件下,Cys³⁰也是完全离子化的,因而具有很高的反应活性,同时 33 位上的残基对其 pK_a 值有着重要的影响。Cys³⁰的低 pK_a 值正好解释了 Glockshuber 等^[19]发现的 DsbA 在低 pH(甚至 pH 4)的情况下也能够有效地催化二硫键的成的现象。Glockshuber 等^[20]对 DsbA 活性中心的两个半胱氨酸进行了定点突变,发现仅一个 Cys³⁰半胱氨酸亦足以催化巯基-二硫键的相互作用,并完成蛋白质的氧化折叠。Bardwell 等^[21]将 DsbA 的活性中心的四个残基都进行了定点突变,得到了 APHA、CPPC、CSTC、CLTC、CPSC、CPRC 和 CPLC 等突变子,并通过考察这些突变子与 GSH/GSSG 的平衡情况以及不同浓度盐

酸胍下的变性曲线,说明了 DsbA 的氧化性极强,既与二硫键使氧化型的 DsbA 变得不稳定有关,也与 Cys³⁰ 极低的 pK_a 值有关,即是 Glockshuber 和 Creighton 分析原因的综合。另外,他们还指出,His³²、Glu³⁷、Glu³⁸、Gln⁹⁷都对决定 DsbA 的氧化还原势起着很大的作用。Schmid 等^[22]采用定点突变的方式,将 Cys³³替换为 Ala,并使其与 C2S/C10N-RNase T1 作用,发现当发生 C33A 突变的 DsbA 与其结合时,DsbA 的变性自由能 ΔG_D 增加了 4.7kJ/mol,也就说明了 DsbA 与未折叠的 RNase T1 之间除了共价的二硫键结合以外,还存在着有利的非共价作用(favorable non-covalent interaction),而且这种作用还增强了 DsbA 与未折叠蛋白间的结合。

Maria 等^[23]采用了 QM/MM 算法比较了 DsbA 与硫氧还原蛋白活性中心的二硫键发现两者 pK_a 值相差 4.5,与大多数实验吻合很好。另外还发现,该 pK_a 值的差异来自于 $\alpha 2$ - α 螺旋,它对 DsbA 的巯基的稳定作用在一定程度上大于其对硫氧还原蛋白的巯基,通过将硫氧还原蛋白中的保留残基 Asp²⁶和 Lys⁵⁷以及 DsbA 中的保留残基 Gly²⁴和 Lys⁵⁸(见图 2)定点突变为丙氨酸不会影响两者的 pK_a 值,但这些保留残基对稳定亲核的巯基却起着重要的作用。

Bardwell 等^[24]猜想 DsbA 和醌与 DsbB 的作用位点不同,并成功地证实了 DsbB 的 Gln³³和 Tyr⁴⁶残基与 DsbA 相互作用,而 Gln⁹⁸和 Arg⁴⁸则与醌相互作用,且 DsbA 是通过 Met¹⁵³残基和 DsbB 相作用。

除了上述关于针对活性中心的残基进行的研究外,也有研究表明 Pro¹⁵¹对于 DsbA 的结构稳定以及活性都有着重要的影响^[25-27]。顺式的 Pro¹⁵¹与 Cys³⁰的相互作用维持了 DsbA 的硫氧还原蛋白结构域,并使氧化型的 DsbA 结构趋于不稳定,即加强了其氧化性和二硫键的转移活性,而且其中的 5 种 Pro¹⁵¹的定点突变子还会造成 DsbA-DsbB 的结合物在体内的累积。

除此之外,Wang 等^[28]提出 DsbA 具有类似于分子伴侣活性的功能。他们通过研究发现,DsbA 同样能介导一些不含有二硫键的蛋白,如 D-3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)和硫氰酸酶复性,而且 DsbA 还能像分子伴侣一样有效地阻止变性的 GAPDH 聚集。

2.3 Dsb 家族中各成员的协同作用^[29-30]

在大肠杆菌体内,新合成的含有二硫键的分泌表达肽链的折叠一般是在周质胞腔中完成的,其间,Dsb 家族各成员蛋白的共同参与协助大大地加快了

其折叠过程。图4为Dsb家族成员蛋白协助新生肽链折叠过程的示意图,整个过程分为二硫键的氧化

形成和还原异构两个途径,显然,二硫键的形成实际上是通过电子的传递来驱动的:

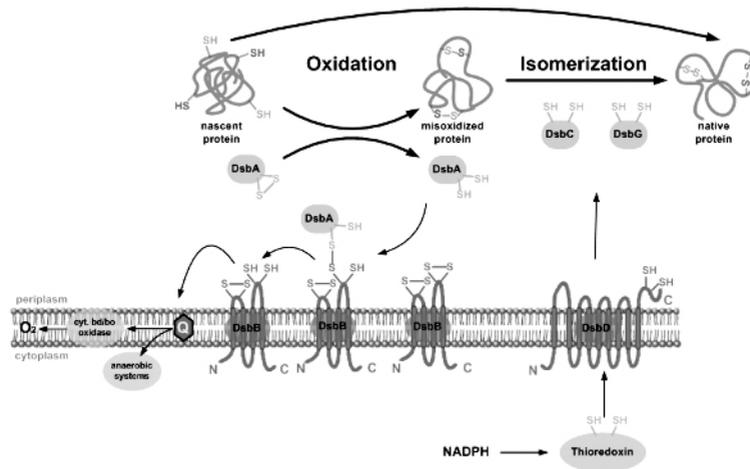


图4 Dsb家族成员参与的协助新生肽链折叠的途径,包括氧化途径(左)和异构途径(右)。

黑色细箭头代表了整个折叠途径中电子的流向。

Fig.4 The scheme of the oxidation pathway (left) and isomerization pathway (right) in the newly synthesized proteins folding to its native state *in vivo*, with the assistance of the Dsb family members.

The thin black arrows indicate the flow of electrons in the whole folding procedure.

具有强氧化性的DsbA同新生肽链接触后迅速将其氧化使之形成链内的二硫键结构,而DsbA自身被还原。被还原的DsbA与膜蛋白DsbB作用,由DsbB重新氧化,这个过程中,首先是由DsbA的Cys³³与DsbB的Cys¹⁰⁴作用形成链间的混合二硫键,然后再被其氧化。在有氧条件下,DsbB将电子传递给氧化态的辅酶Q,而辅酶Q再将电子传递给细胞色素氧化酶,最后细胞色素氧化酶再还原氧气。而在厌氧条件下,DsbB将电子传递给维生素K,然后电子进一步传递到延胡索酸还原酶或者硝酸盐还原酶。这样,DsbB利用苯醌的氧化能力重新形成了二硫键。如图4的左半部分。

如果被DsbA氧化的新生肽链含有两个以上半胱氨酸,它在被氧化的时候就极有可能形成错配的二硫键,这样就必须经过重排以形成天然态正确配对的二硫键,这是由二硫键异构酶DsbC与DsbG来完成的。DsbC中的Cys⁹⁸首先攻击蛋白质中不正确的二硫键,并与错误折叠的蛋白质形成了混合的二硫键。然后,或者这个错误折叠的蛋白质的另一个半胱氨酸去攻击该混合二硫键使之分开,再在底物与还原态的DsbC之间形成一个更稳定的二硫键;或者用DsbC的Cys¹⁰¹攻击这个混合二硫键使之分开。这样,DsbC变成了氧化态,需要被膜蛋白DsbD重新还原才能再生使用。而DsbD则是通过硫氧还原蛋白的还原能力来保持还原态的,硫氧还原蛋白是先

被硫氧还原蛋白还原酶还原,再被NADPH还原的。如图4的右半部分。

如上所述的整个Dsb家族成员协作帮助新生肽链的折叠过程,不但说明了形成二硫键的氧化能力从何而来,还显示了蛋白质的氧化折叠和细胞的新陈代谢完全是通过电子传递的方式耦联在一起的。

3 DsbA协助蛋白质折叠机理及研究

对于DsbA的结构及性质的研究已经取得了相当多的数据和理论依据,而关于DsbA在下游协助蛋白质复性方面的研究并不深入,仅有部分文献进行了系统的报道。DsbA协助蛋白质复性的途径一般分为两种,一种是直接在体内协助蛋白的复性,即融合表达,将DsbA的基因同目标基因共表达,使得异源蛋白在合成的同时就在DsbA的协助下完成了复性;另一种途径是将重组的DsbA分离出来后,再在体外利用其协助蛋白质复性。

3.1 DsbA协助下的体内折叠

DsbA在体内协助异源蛋白的表达,用得最多的方法就是将DsbA与该异源蛋白进行共表达,这样才能保证宿主菌中有足够的DsbA来辅助快速合成的基因工程的异源蛋白折叠形成正确的三维结构。

Glockshuber等^[31]将Ragi双功能抑制子(Ragi bifunctional inhibitor, RBI)的基因同细菌的OmpA信号肽基因融合以后,再利用双顺反子操纵子与DsbA

基因一起在乳糖操纵子下进行共表达,尽管得到的最适分泌表达 RBI 和达到 RBI 最佳收率的氧化还原环境条件有所差异(作者未进行具体的优化实验),但是在培养基中添加 GSH 后, RBI 与 DsbA 的共表达使正确折叠的 RBI 提高了 14 倍之多。Mascarenhas 等^[32]将 DsbA 的突变子同转移生长因子- β -2 (transforming growth factor- β -2, TGF- β -2) 类胰岛素生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)等 10 种异源的真核蛋白基因进行了融合表达,发现其可溶性大大增加了。

3.2 DsbA 协助下的体外折叠

一般地, DsbA 体外协助蛋白质复性首先要制备以及纯化大量的重组 DsbA^[33], 然后再将其同变性蛋白或者基因工程形成的包涵体单边相互作用, 使目标蛋白折叠形成正确配对的二硫键, 在此过程中, 通常要添加适当比例的氧化还原对, 如 GSH/GSSG 等来帮助被目标蛋白还原的 DsbA 能够重新氧化利用。Ito 等^[51]在含 0.9mmol/L GSSG、0.6mmol/L DTT 的复性液中, 加入 DsbA 60min 后, 还原型的 RNase A 活性恢复 40%, 而未添加 DsbA 的对照组仅恢复了 15%。同时为了验证 DsbA 还能催化已形成的二硫键异构, 他们使用了错配的 RNase A 进行考察, 发现添加 DsbA 的实验组 RNase A 的活性回收率明显高于对照组, 并且这种现象同添加的 DsbA 的浓度没有关系。Creighton 等^[18]在操作条件为 0.5mmol/L GSSG、2mmol/L GSH、pH7.5、25℃ 下对牛胰蛋白酶抑制剂(bovine pancreatic trypsin inhibitor, BPTI)进行复性, 添加 DsbA 的实验组, 16min 后 BPTI 的活性恢复了 20%, 而对照组只恢复了 13%。Glockshuber 等^[19]在 pH8.7 含有 GSH、GSSG 各 1mmol/L 的缓冲液中, 变性的水蛭素经过 4h 能完全恢复活性, 按照两者巯基比为 1:10 添加 DsbA 以后, 整个复性过程明显加快了 2~3 倍。而且 DsbA 的这个活性在低 pH 的条件下表现得更为明显, pH6.0 的溶液中, 水蛭素基本不能进行自发复性, 然而甚至在 pH4.0 的条件下, 添加 DsbA 也同样能使水蛭素很快地完全复性。Ito 等^[51]研究了碱性磷酸酯酶(alkaline phosphatase, PhoA)在 DsbA 协助复性过程中的三个状态:未折叠态(对胰蛋白酶完全敏感)、折叠中间态(对胰蛋白酶有部分抗性的单体)以及具有活性的二聚体。将新合成的 PhoA 和 GSSG、间周质蛋白或纯化后的 DsbA 在 Zn^{2+} 存在的情况下, 能够有效地折叠成为具有活性的二聚体。Schmid 等^[22]将 5 μ mol/L 的 C2S/C10N-

RNase T1 同 8 μ mol/L 的 DsbA 作用, 不论开始的时候还原型的 C2S/C10N-RNase T1 是折叠态还是非折叠态, $t_{1/2}$ 大约都为 10s 左右, 且最后都能折叠成二硫键正确配对的天然态构象。

Fersht 等^[34]将小分子伴侣(minichaperone sht GroEL191-345)、DsbA 以及脯氨酸顺反异构酶共固定化在琼脂糖凝胶上, 将极难复性的蝎毒 Cn5 通过该氧化复性层析柱进行复性, 活性收率达到了 87%。Glockshuber 等由于在体外复性 RBI 时没有添加 GSSG, 导致被还原的 DsbA 不能像融合表达^[31]那样可以被胞内的 DsbB 重新氧化, 因而 DsbA 不能表现出其异构酶的活性, 而 RBI 的复性过程就停滞在形成分子内错配二硫键的阶段。

本实验室也进行了重组 DsbA 体外协助蛋白质复性实验, 以溶菌酶为模型蛋白, 游离以及固定化的 DsbA 协助溶菌酶体外复性均取得了较好的结果。当初始溶菌酶浓度为 280 μ g/mL, DsbA 与溶菌酶的摩尔比为 1:1 时, 溶菌酶蛋白回收率可达 100%, 比活为 25 900u/mg, 较之稀释复性要达到相同的回收率和比活所处理的初始蛋白浓度(50 μ g/mL)有很大的提高。固定化的 DsbA 协助溶菌酶体外复性实验表明, DsbA 的加入能够在高浓度下有效地促进含有二硫键的蛋白质的复性, 提高酶活和活性收率。

4 展 望

DsbA 的基因从发现至今, 大量的科研工作者对其性质和结构进行了详尽的研究及分析, 不仅发现了其强氧化性来自于具有极低的 pK_a 值 Cys³⁰ 和使氧化型的 DsbA 活性中心的二硫键变得不稳定, 而且确认了活性中心上的 Cys³⁰ 是唯一重要的氨基酸残基, 但在 DsbA 协助蛋白质复性方面的研究工作才刚刚起步。

在 DsbA 的结构研究方面, 根据图 2 的多序列比对, 除了活性中心 CXXC 的高度保守以外, 还有数个 Phe 及 Val 的保守位点, 这些疏水性的氨基酸, 特别是几个 Phe, 在三维结构上都处于活性中心附近, 如图 1, 它们的高度保守很可能与它们的生物学活性有关。新生待折叠的肽链或变性蛋白首先要能够接近 DsbA 的活性中心才能被其氧化, 而这些分布于 DsbA 活性中心附近的强疏水性氨基酸形成的疏水部位就是底物蛋白与 DsbA 进行疏水结合的位点。可以通过定点突变的方法, 考察在这些 Phe 位点发生突变的突变子蛋白在复性过程中同底物蛋白的结合情况可以推测这些位点的生物学功能。

在 DsbA 协助蛋白质复性方面,已有的研究大都集中在考察其协助复性的可行性方面,而并未实际深入考察其协助复性的效率。而对于富含二硫键的基因工程蛋白质,其包涵体外重折叠效率极低。表 1 给出了含有不同个数自由巯基的蛋白质中可以形成可能的二硫键的配对数目,在众多的配对可能性中,由于只有一种配对是符合天然构象的正确配对,不难看出,随着目标蛋白中的自由巯基数量的增加,随机形成正确配对的二硫键的可能性就越低,这样就大大地增加了含有多对二硫键的目标蛋白的复性难度,因而将 DsbA 作为折叠酶引入到复性体系中,配合适当的氧化还原环境,可以提高巯基-二硫键间的氧化形成与还原异构的反应速度,从而在很大程度上提高正确配对二硫键形成的概率,提高复性的效率。

表 1 二硫键配对数目随着自由巯基的增加成几何级数增长

Table 1 Exponential augment of combinations of disulfide bonds with increasing free thiols*

No. of free thiols	4	6	8	10	12
No. of disulfide bonds	2	3	4	5	6
No. of combinations	3	15	105	945	10395

* Number of combinations can be calculated by $(n-1)!!$, where n is the number of free thiols.

在今后的研究中,一方面体内协助复性可以考察 DsbA 与某些目标蛋白进行融合表达,另一方面,体外协助复性可以首先选取模型蛋白进行复性过程及条件的摸索,然后再针对真实的目标对象包涵体进行复性,在这个过程中,热力学和动力学方面的实验应该引起足够的重视,特别是对一些复性折叠中间体的表征及热力学分析。从热力学角度来讲,天然态的蛋白是蛋白质的能量最低状态,即结构最稳定状态。尽管聚集甚至沉淀状态的能量高于天然态,但是由于从中间体折叠到天然态之间有一个很高的能垒,造成中间体到天然态的转化是一个慢的过程。从化学动力学角度来看,蛋白质复性的过程中存在的主要矛盾就是折叠和聚集间的竞争,由于中间体向天然态的转化是一级反应,而聚集则是二级或多级反应,聚集的反应速度与蛋白质浓度的平方或高次方成正比,而复性反应过程仅与蛋白质浓度的一次方成正比,因而蛋白质浓度越大,聚集速度越快。当溶液中离子强度或变性剂浓度很低,又无其它辅助手段存在时,聚集趋势占主导地位,导致蛋白质的自发复性效率极低。尽管 DsbA 的添加会造成蛋白浓度的升高,但是由于正确折叠的蛋白将疏水

基团进行了包埋,从而降低了聚集的可能性,DsbA 的加入会大大提高蛋白的复性效率。

由于固定化的 DsbA 也成功地应用于氧化层析复性^[32],但并未有深入考察柱上复性的过程及机理,这也是以后的一个研究方向之一。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Saito N, Yura K, Fukuda Y. Some remarks on protein folding. In: *Protein Structural Analysis, Folding and Design*. Edited by Hatano M. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1990 pp. 19 - 36.
- [2] Nelson JW, Creighton TE. Reactivity and ionization of the active site cysteine residues of DsbA, a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Biochemistry*, 1994, **33**: 5974 - 5983.
- [3] Swaisgood HE. The importance of disulfide bridging. *Biotechnology Advances*, 2005, **23**: 71 - 73.
- [4] Bardwell JCA, McGovern K, Beckwith J. Identification of a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Cell*, 1991, **67**(3): 581 - 589.
- [5] Kamitani S, Akiyama Y, Ito K. Identification and characterization of an *Escherichia coli* gene required for the formation of correctly folded alkaline phosphatase, a periplasmic enzyme. *The EMBO Journal*, 1992, **11**(1): 57 - 62.
- [6] Plunkett G, Burland V, Daniels DL, *et al.* Analysis of the *Escherichia coli* genome. III. DNA sequence of the region from 87.2 to 89.2 minutes. *Nucleic Acids Research*, 1993, **21**(15): 3391 - 3398.
- [7] Missiakas D, Raina S. Protein folding in the bacterial periplasm. *Journal of Bacteriology*, 1997, **179**(8): 2465.
- [8] Guddat JW, Bardwell JCA, Zander T, *et al.* The uncharged surface features surrounding the active site of *Escherichia coli* DsbA are conserved and are implicated in peptide bonding. *Protein Science*, 1997, **6**: 1148 - 1156.
- [9] Martin JL, Bardwell JCA, Kurlyan J. Crystal structure of the DsbA protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Nature*, 1993, **365**: 464 - 468.
- [10] Schirra HJ, Renner C, Czisch M, *et al.* Structure of reduced DsbA from *Escherichia coli* in solution. *Biochemistry*, 1998, **37**: 6263 - 6276.
- [11] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, **24**: 4876 - 4882.
- [12] Perriere G, Gouy M. WWW-Query: An on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie*, 1996, **78**: 364 - 369.
- [13] Wunderlich M, Glockshuber R. Redox properties of protein disulfide isomerase (DsbA) from *Escherichia coli*. *Protein Science*, 1993, **2**: 717 - 726.
- [14] Wunderlich M, Jaenicke R, Glockshuber R. The Redox properties of protein disulfide isomerase (DsbA) of *Escherichia coli* result from a tense conformation of its oxidized form. *Journal of Molecular*

- [15] Zapun A , Bardwell JCA , Creighton TE. The reactive and destabilizing disulfide bond of DsbA , a protein required for protein disulfide bond formation *in vivo*. *Biochemistry* , 1993 , **32** : 5083 – 5392.
- [16] Hennecke J , Sillen A , Huber-Wunderlich M , *et al.* Quenching of tryptophan fluorescence by the active-site disulfide bridge in the DsbA protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* , 1997 , **35** : 6391 – 6400.
- [17] Vinci F , Couprie J , Pucci P , *et al.* Description of the topographical changes associated to the different stages of the DsbA catalytic cycle. *Protein Science* , 2002 , **11** : 1600 – 1612.
- [18] Zapun A , Cooper L , Creighton TE. Replacement of the active-site cysteine residues of DsbA , a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Biochemistry* , 1994 , **33** : 1907 – 1914.
- [19] Wunderlich M , Otto A , Seckler R , *et al.* Bacterial protein disulfide isomerase : efficient catalysis of oxidative protein folding at acidic pH. *Biochemistry* , 1993 , **32** : 12251 – 12256.
- [20] Wunderlich M , Otto A , Maskos K , *et al.* Efficient catalysis of disulfide formation during protein folding with a single active-site cysteine. *The Journal of Molecular Biology* , 1995 , **247** : 28 – 33.
- [21] Grauschopf U , Winther RJ , Korber P , *et al.* Why is DsbA such an oxidizing disulfide catalyst ? *Cell* , 1995 , **83** : 947 – 955.
- [22] Frech C , Wunderlich M , Glockshuber R , *et al.* Preferential binding of an unfolded protein to DsbA. *The EMBO Journal* , 1996 , **15** : 392 – 398.
- [23] Alexandra CTP , Fernandes PA , Maria RJ. Determination of the ΔpK_s between the active site cysteines of thioredoxin and DsbA. *Journal of Computational Chemistry* , 2006 , **27**(8) : 966 – 975.
- [24] Tan J , Lu Y , Bardwell JCA. Mutational analysis of the disulfide catalysts DsbA and DsbB. *Journal of Bacteriology* , 2005 , **187**(4) : 1504 – 1510.
- [25] Kadokura H , Tian H , Zander T , *et al.* Snapshots of DsbA in action : detection of proteins in the process of oxidative folding. *Science* , 2004 , **303** : 534 – 537.
- [26] Kadokura H , Nichols L , Beckwith J. Mutational alterations of the key *cis* proline residue that cause accumulation of enzymatic reaction intermediates of DsbA , a member of the thioredoxin superfamily. *Journal of Bacteriology* , 2005 , **187**(4) : 1519 – 1522.
- [27] Charbonnier JB , Belin P , Moutiez M , *et al.* On the role of the *cis*-proline residue in the active site of DsbA. *Protein Science* , 1998 , **8** : 96 – 105.
- [28] Zheng WD , Quan H , Song JL , *et al.* Does DsbA have chaperone-like activity ? *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 1997 , **337**(2) : 326 – 331.
- [29] Debarbieux L , Beckwith J. Electron avenue : Pathways of disulfide bond formation and isomerization. *Cell* , 1999 , **99** : 117 – 119.
- [30] Collet JF , Bardwell JCA. Oxidative protein folding in bacteria. *Molecular Microbiology* , 2002 , **44**(1) : 1 – 8.
- [31] Wunderlich M , Glockshuber R. *In vivo* control of redox potential during protein folding catalyzed by bacterial protein disulfide-isomerase (DsbA). *The Journal of Biological Chemistry* , 1993 , **268**(33) : 24547 – 24550.
- [32] Zhang Y , Olsen DR , Nguyen KB , *et al.* Expression of eukaryotic proteins in soluble form in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* , 1998 , **12** : 159 – 165.
- [33] Luo M (罗曼) , Guan YX (关怡新) , Yao SJ (姚善泾). Statistical optimization of protein disulfide isomerase expression in *E. coli*. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology* (中国生物化学与分子生物学报) , 2005 , **21**(3) : 376 – 383.
- [34] Altamirano MM , Garcia C , Possani LD , *et al.* Oxidative refolding chromatography : folding of the scorpion toxin Cn5. *Nature Biotechnology* , 1999 , **17** : 187 – 191.