再生丝素蛋白在水溶液中构象转变的 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子效应

宗小红 周平* 邵正中 王洪海 淳于利娟

(复旦大学高分子科学系, 聚合物分子工程教育部重点实验室, 上海 200433; 复旦大学遗传所, 上海 200433.)

* 联系人, E-mail: pingzhou@fudan.edu.cn

摘要 蚕丝由于其出色的材料性能, 引起人们对蚕丝基础及应用研究的广泛关注, 其中丝蛋白与金属离子的相互作用一直是人们研究的热点. 利用远紫外圆二色谱(circular dichroism, CD)方法研究了水溶液中金属离子 $\text{Cu}(\text{II})$ 对丝素蛋白构象的影响. 结果表明, 一定量 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子的引入有利于丝素蛋白分子链从无规卷曲向 β -折叠构象的转变, 然而 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子的进一步增加反而会抑制 β -折叠构象的形成. 同时研究结果还表明, $\text{Cu}(\text{II})$ 离子对丝素蛋白构象的影响遵循“成核依赖性”机理. 这一机理与存在于中枢神经系统中的朊蛋白在 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子诱导下的病变过程非常类似. 因此, 深入研究金属离子对丝素蛋白构象的影响不仅可以使我们对蚕吐丝过程能有更进一步的认识, 而且还可以将易于获得的稳定丝素蛋白作为模型蛋白, 为中枢神经系统疾病的研究提供帮助.

关键词 丝素蛋白 构象转变 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子 圆二色谱

在生命体系中, 无机金属离子始终伴随着蛋白质、核酸等重要的生物分子, 发挥着不可或缺的作用. 研究表明在桑蚕丝腺体内的丝素蛋白含有多种金属离子, 且浓度随着腺体的部位不同而发生变化^[1], 同时这些离子促进了丝素蛋白凝胶-溶胶之间的转变以及丝纤维的形成. 人们已经通过流变测试、核磁共振以及二维拉曼光谱等方法证实 $\text{K}(\text{I})$ 和 $\text{Ca}(\text{II})$ 等离子能对丝素蛋白的构象产生影响, 但其他离子的影响机理并不清楚^[1~4, 11]. 质子诱导X射线发射(proton induced X-ray emission, PIXE)分析表明, 在桑蚕腺体中, 丝素蛋白含有 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子^[5], 但 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子的含量远远低于 $\text{K}(\text{I})$, $\text{Ca}(\text{II})$ 等其他金属离子^[5]. 我们曾对丝素蛋白水溶液自然干燥而形成的膜进行研究, 发现一定量 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子的引入促进丝素蛋白膜的结构从Silk (主要由螺旋构象组成)向Silk (主要由 β -折叠构象组成)的转变, 并且随着 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子浓度的进一步增加, 丝素蛋白膜中Silk 的含量又逐渐降低^[6]. 电子顺磁共振(electron paramagnetic resonance, EPR)结果表明^[6], 在一定pH条件下, $\text{Cu}(\text{II})$ 离子对丝素蛋白构象的影响主要是由于 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子与蛋白质分子中的羧基和亚胺基, 以及侧基中的咪唑基、羟基形成了稳定的配合物, 从而改变了丝素蛋白分子链的二级结构. 最近, 人们发现 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子的代谢异常能引起中枢神经系统的功能紊乱, 并且也认为主要是由于

$\text{Cu}(\text{II})$ 离子与朊蛋白(Prion)相结合, 而导致正常PrP (Prion protein)基因产物 PrP^{C} 构象由 α -螺旋向 β -折叠转变. 随着 β -折叠增加和聚集, 产生了淀粉状纤维沉淀, 形成了致病的 PrP^{Sc} , 从而引起很多中枢神经系统疾病, 如疯牛病(Bovine Spongiform Encephalopathy)、人的脑软化病(Grethmann-Straussner-Scheinker)及克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob-Disease)等^[7~10].

我们在前期工作中曾对 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子影响丝素蛋白膜结构进行了研究, 为模拟蚕的吐丝过程, 研究中涉及到丝素蛋白中水分的逐渐挥发以及丝素蛋白浓度和pH的变化等因素^[6], 为了进一步研究 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子在没有这些作用时如何影响丝素蛋白构象转变, 本文研究了稀溶液中丝素蛋白构象转变的 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子依赖效应. 由于丝素蛋白很容易获得, 且相对较稳定, 因而深入研究金属离子对丝素蛋白构象的影响不仅可以使我们能加深对蚕的吐丝过程的认识, 同时还可以将丝素蛋白作为模型物, 为中枢神经系统疾病的研究提供帮助.

1 样品的制备及表征

() 样品的制备. 根据文献[6]方法制备浓度为4%(质量分数)的再生丝素蛋白(silk fibroin, SF)溶液. 取部分母液用去离子水小心稀释为1 mg/mL备用. PIXE的测量结果表明^[5], 再生丝素蛋白中Cu元素的

1) 李贵阳. 丝素蛋白构象转变机理及其分子结构的研究. 复旦大学硕士学位论文, 2001.

含量为 (0.018 ± 0.002) mg Cu()/g SF, 因此, 实验中将 0.1 mol/L 的 CuSO₄ 溶液按一定比例, 即 1, 5, 10, 20, 50 和 100 倍于原始丝素蛋白样品(空白样品)中 Cu() 离子含量的剂量加入至配好的丝素蛋白溶液中, 所得 Cu()-SF 混合溶液的 Cu() 含量分别近似为 0.018, 0.090, 0.180, 0.360, 0.900, 1.800 mg Cu()/g SF, 并将每一样品的丝素蛋白总浓度稀释至 0.1 mg/mL (pH 约 6.5) 作为 CD 测量之用. 为文中表述方便, 这些样品分别被表示为 Cu18, Cu90, Cu180, Cu360, Cu900 和 Cu1800.

() 圆二色谱(CD)实验. 本实验采用 Jasco J-715(NESLAB RTE-111)圆二色谱谱仪. 氮气流量控制在 15 mL/min 左右, 图谱分辨率 0.1 nm, 扫描范围从 190 nm 到 250 nm, 扫描次数 6 次, 扫描速率 100 nm/min, 响应时间 0.5 秒, 石英测量池光径 0.1 cm. 圆二色性用平均氨基酸残基椭圆值 $[\theta]$ (mean residue ellipticity) 表示, 单位 $(^\circ) \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$, 由如下公式^[12]计算:

$$[\theta] = \frac{78\theta_{\text{obs}}}{10 \times c \times d},$$

这里 θ_{obs} 是测得的椭圆值 $(^\circ)$, 78 是丝素蛋白中氨基酸残基的平均分子量^[11], d 是光径(cm), c 是蛋白质浓度(g/mL).

蛋白质的各种二级结构(α -螺旋、 β -折叠、转角、无规卷曲)在远紫外圆二色谱(178 ~ 250 nm)区域存在特征峰^[12]. 如无规卷曲结构的特征峰为 195 nm 左右的一个负强峰(负科顿效应, negative Cotton effect); 而 β -折叠的特征峰为 217 nm 处的一个负宽峰及 198 nm 处的一个正强峰(正科顿效应, positive Cotton effect); 对于 α -螺旋则对应于 192 nm(正)、209 nm(负)以及 222 nm(负)三个峰位.

2 结果与讨论

图 1 是含不同 Cu() 离子浓度再生丝素蛋白溶液(0.1 mg/mL)的构象随培养时间变化的 CD 图谱. 在新鲜制备的 Cu()-SF 混合溶液中, 195 nm 处均有一个明显的负吸收峰(图中培养时间为 0 h 的曲线), 表明此时大多数结构为无规卷曲^[13]. 随着溶液培养时间的增加, 特别是经过一个较长的“延迟期”(lag time), 这种负科顿效应逐渐被 197 nm 的正科顿效应所替代, 并且在 217 nm 的负峰同时增强. 197 nm 处的正科顿效应和 217 nm 处的负科顿效应都是 β -折叠构象的特

征峰^[12,13], 表明在此过程中发生了无规卷曲向 β -折叠的构象转变, 而且转变速度呈加速状态.

为易于定性比较, 我们将这些 CD 光谱在 217 nm 处的椭圆度用如下表达式归一化^[14]:

$$[\theta]_{217}^{\text{nor}} = \frac{[\theta]_{217}^{\text{obs}} - [\theta]_{217}^0}{[\theta]_{217}^{\text{max}} - [\theta]_{217}^0},$$

这里 $[\theta]_{217}^{\text{nor}}$ 是归一化椭圆度, $[\theta]_{217}^0$ 是新鲜制备的空白丝素蛋白溶液在 217 nm 处的椭圆度值. $[\theta]_{217}^{\text{obs}}$ 是 Cu()-SF 混合样品培养一定时间在 217 nm 处测得的椭圆度值, $[\theta]_{217}^{\text{max}}$ 是样品培养相当长时间后观测到的空白丝素蛋白溶液在 217 nm 处的最大椭圆度值.

此公式的分母代表空白样品中无规卷曲构象在所研究的时间范围内所能转变成的 β -折叠总量. 这个归一化椭圆度值其实就是特定时间内该样品所含 β -折叠构象与空白样品所含 β -折叠构象的比值. 因此我们可以得到如图 2 所示的不同 Cu() 离子浓度下丝素蛋白溶液中 β -折叠含量随时间变化的关系. 我们清楚地看到, 这一伴随着“延迟期”(>300 h)之后 β -折叠含量的加速过程, 正是我们曾提到的“成核依赖性”(nucleation dependence)的蛋白质变性过程^[14]. 在“延迟期”期间, 存在着 β -折叠结构的成核过程, 之后存在着核的增长与聚集, 且其速度随蛋白质的浓度成线性关系. 有意义的是, 这一现象还存在于神经系统中心肮蛋白^[15,16]、 $\text{A}\beta$ 淀粉状蛋白^[17,18]的变异过程中.

通过图 2 中不同 Cu() 离子浓度对丝素蛋白构象转变影响的比较我们可以看到, 少量 Cu() 离子的引入, 如当 Cu() 离子浓度为 0.090(曲线 2, Cu90) 和 0.180(曲线 3, Cu180) mg/g SF 时, 丝素蛋白溶液中的 β -折叠含量增长速度比空白样品(曲线 1, Cu18)快, 而进一步引入 Cu(), 如 Cu() 离子的浓度分别为 0.360(曲线 4, Cu360)、0.900(曲线 5, Cu900) 以及 1.800(曲线 6, Cu1800) mg/g SF 时, 其 β -折叠含量的增长速度滞后于空白样品. 其中 Cu900 样品中的 β -折叠增长速度远不如空白样品及其他含 Cu() 离子浓度较低的样品, 而 Cu1800 样品在观测的时间范围内尚无 β -折叠构象出现的迹象. 这些结果表明, 稀溶液中少量的 Cu() 离子可以促进丝素蛋白分子从无规卷曲向 β -折叠转变, 而随着 Cu() 离子浓度的进一步增加反而抑制了这一构象转变.

本文中所发现的稀溶液中丝素蛋白的构象转变现象, 与 Cu() 在丝素蛋白的固体膜中的影响结果

图1 不同Cu()离子浓度的Cu()-SF稀溶液(0.1 mg/mL)中SF构象随培养时间而转变的CD光谱
(a)~(f) Cu()离子浓度依次为0.018(Cu18), 0.090(Cu90), 0.180(Cu180), 0.360(Cu360), 0.900(Cu900)和1.800(Cu1800) mg Cu()/g (SF).
曲线1~8 样品培养时间从0~414 h

相一致^[6],只是在稀溶液体系中这一转变过程远没有固体膜样品中明显.这一方面是由于在丝素蛋白膜的制备过程中,水分的逐渐减少对丝素蛋白的构象转变有明显的促进作用^[19];另一方面是由两种所测

图 2 不同 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子浓度下, 丝素蛋白溶液中 β -折叠含量随时间增长的曲线

曲线 1~6 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子在丝素蛋白中相对含量依次为: 0.018(Cu18, 空白样品), 0.090(Cu90), 0.18(Cu180), 0.36(Cu360), 0.90(Cu900) 和 1.80(Cu1800) $\text{mg Cu}(\text{II})/\text{g}(\text{SF})$

样品中丝素蛋白浓度的不同所造成的. 根据蛋白质构象转变的“成核依赖性”机理, 丝素蛋白的构象转变速度与蛋白质浓度成线性关系. 在固体膜样品的制备中, 初始丝素蛋白溶液浓度要比用于 CD 光谱实验的丝素蛋白溶液浓度高出近 40 倍. 事实上, 蚕腺体中丝素蛋白的浓度高达 30%(质量分数), 因此腺体内离子的存在对构象转变的影响可能敏感得多.

近年来在对许多生物体系中存在的一种称为“成核依赖性”的聚集过程^[15,16,18]的研究表明, $\text{Al}(\text{III})$ ^[20]、 $\text{Zn}(\text{II})$ ^[21]和 $\text{Cu}(\text{II})$ ^[22]等离子的存在有利于 $\text{A}\beta$ 淀粉状蛋白的形成. 我们前期的工作也发现, 蚕的吐丝过程也遵循这种成核依赖性聚集过程的一级反应动力学特征^[14], 即蚕丝蛋白的构象变化只有在一定尺寸的 β -折叠聚集体, 即“核”或“种子”的存在下才能发生. Miura^[23]和 Aronoff-Spencer^[9]等人发现胰蛋白中的八肽片段 PHGGGWGQ 可以和 $\text{Cu}(\text{II})$ 形成稳定的络合物, 从而导致胰蛋白的构象由 α -螺旋向 β -折叠的转变. 我们在对丝素蛋白固体膜样品的 EPR 和 NMR 研究中发现^[6], 在 pH 等于 5.2 ~ 6.9 时, $\text{Cu}(\text{II})$ 离子与丝素蛋白分子中“柔性”肽链片段 AHGGYSGY 也可以发生类似于 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子与 PHGGGWGQ 形成的络

合物. 其中, $\text{Cu}(\text{II})$ 离子与肽链中组氨酸残基 $\text{H}(\text{His})$ 形成 $\text{His}(\text{N}_\tau)\text{-Cu}(\text{II})\text{-His}(\text{N}_\tau)$ 桥键, 而这一结构有利于分子链间氢键的形成, 进而促进了 β -折叠构象的形成以及聚集. 当 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子的含量超过一定范围时, $\text{Cu}(\text{II})$ 离子的引入反而破坏了 $\text{His}(\text{N}_\tau)\text{-Cu}(\text{II})\text{-His}(\text{N}_\tau)$ 桥键, 导致 β -折叠构象的减少. 并且, 一旦蛋白质分子上附带了过多的正离子, 相互之间的静电斥力也随之增大, 这就使得分子链间的氢键作用变得较为困难. 因此随着 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子更多的引入, 体系中 β -折叠结构的含量又降低. 正是这个原因, 样品 Cu360, Cu900 与 Cu1800 在同样的培养时间内 β -折叠含量不如其他样品增长得快.

综上所述, 少量 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子的引入促进了丝素蛋白的构象由无规卷曲向 β -折叠转变, 然而进一步增加 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子反而会抑制 β -折叠构象的形成. 事实上, 在蚕的吐丝过程中, 除了 $\text{Cu}(\text{II})$ 的影响, 还存在着许多其他的影响因素, 如金属离子 $\text{Ca}(\text{II})$ ^[11,4,5], $\text{K}(\text{I})$ ^[11] 和 $\text{Zn}(\text{II})$ ^[1] 等的存在、拉伸流动^[24,25]、剪切应力^[10]、pH 变化^[4,6,26]、水分的逐渐减少^[41,2] 等等. 正是这些因素的综合作用, 使得蚕可以在常温常压下吐出性能优异的丝. 同时我们注意到, 上述蚕吐丝过程中的某些影响因素又与那些在神经系统中导致 $\text{A}\beta$ 淀粉蛋白, 胰蛋白等变异过程的因素非常相似. 因此, 我们可以以蚕丝蛋白作为模型蛋白研究那些在一般条件下难以获得的生理活性的 $\text{A}\beta$ 蛋白、胰蛋白等的变性致病机理.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 20274009 和 10475017)资助项目.

参 考 文 献

- 1 Magoshi J, Magoshi Y, Becker M A, et al. Biospinning (Silk Fiber Formation, Multiple Spinning Mechanisms). In: Salamone J C, ed. Polymeric Materials Encyclopedia. Florida: CRC Press, 1996. 667~679
- 2 Tanaka T, Magoshi J, Magoshi Y, et al. Inorganic constitution of silk fibroin. Polymer Prepr, 2001, 42: 623~623
- 3 Kobayashi M, Tanaka T, Inoue S, et al. Rheological behavior of silk fibroin aqueous solution: Gel-sol transition and fiber formation. Polymer Prepr, 2001, 42: 294~295

1) 见 1080 页脚注 1)

2) Yang Z. The effect of water on the structure and dynamics of spider silk and silk like polymers studied by magnetic resonance and X-ray diffraction. Cornell University Doctoral Dissertation, 2001

- 4 Zhou P, Xie X, Knight D P, et al. Effects of pH and Calcium ions on the conformational transitions in silk fibroin using 2D Raman correlation spectroscopy and ^{13}C solid-state NMR. *Biochemistry*, 2004, 43(35): 11302~11311[DOI]
- 5 李贵阳, 周平, 孙尧俊, 等. 金属离子导致的丝素蛋白的构象转变. *高等学校化学学报*, 2001, 22(5): 860~862
- 6 Zong X H, Zhou P, Shao Z Z, et al. Effect of pH and Cu^{2+} on the conformation transitions of Silk Fibroin based on EPR, NMR and Raman Spectroscopy. *Biochemistry*, 2004, 43(38): 11932~11941[DOI]
- 7 Cereghetti G M, Schweiger A, Glockshuber R, et al. Electron Paramagnetic Resonance evidence for binding of Cu^{2+} to the C-terminal domain of the murine prion protein. *Biophys J*, 2001, 81(1): 516~525
- 8 Viles J H, Cohen F E, Prusiner S B, et al. Copper binding to the prion protein: Structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(5): 2042~2047[DOI]
- 9 Aronoff-Spencer E, Burns C S, Avdievich N I, et al. Identification of the Cu^{2+} binding sites in the N-terminal domain of the prion protein by EPR and CD spectroscopy. *Biochemistry*, 2000, 39(45): 13760~13771[DOI]
- 10 Stockel J, Safar J, Wallace A C, et al. Prion protein selectively binds copper(II) ions. *Biochemistry*, 1998, 37(20): 7185~7193[DOI]
- 11 Canetti M, Seves A, Secundo F, et al. CD and small-angle X-ray-scattering of silk fibroin in solution. *Biopolymers*, 1989, 28(9): 1613~1624[DOI]
- 12 Greenfield N. Applications of circular dichroism in protein and peptide analysis. *Trends Anal Chem*, 1999, 18(4): 236~244[DOI]
- 13 Iizuka E, Yang J T. Optical rotatory dispersion and circular dichroism of the beta-form of silk fibroin in solution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1966, 55(5): 1175~1182
- 14 Li G Y, Zhou P, Shao Z Z, et al. Natural silk spinning process. A nucleation-dependent aggregation mechanism? *Eur J Biochem*, 2002, 268(24): 6600~6606
- 15 Morrissey M P, Shakhnovich E I. Evidence for the role of PrP^{C} helix 1 in the hydrophilic seeding of prion aggregates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(20): 11293~11298[DOI]
- 16 Wood S J, Wypych J, Steavenson S, et al. α -Synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of parkinson's disease. *J Biol Chem*, 1999, 274(28): 19509~19512[DOI]
- 17 Jarrett J T, Lansbury P T. Seeding one-dimensional crystallization of amyloid-a pathogenic mechanism in Alzheimers-Disease and Scrapie. *Cell*, 1993, 73(6): 1055~1058[DOI]
- 18 Harper J D, Lansbury P T. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: Mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu Rev Biochem*, 1997, 66: 385~407[DOI]
- 19 Tanaka T, Kobayashi M, Inoue S I, et al. Biospinning: Change of water contents in drawn silk. *J Polym Sci Pt B-Polym Phys*, 2003, 41(3): 274~280[DOI]
- 20 Kawahara M, Muramoto K, Kobayashi K, et al. Aluminum promotes the aggregation of Alzheimers Amyloid beta-protein in-vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 198(2): 531~535[DOI]
- 21 Bush A I, Pettingell W H, Paradis M D, et al. Modulation of a-beta adhesiveness and secretase site cleavage by Zinc. *J Biol Chem*, 1994, 269 (16): 12152~12158
- 22 Atwood C S, Moir R D, Huang X D, et al. Dramatic aggregation of Alzheimer a beta by Cu^{2+} is induced by conditions representing physiological acidosis. *J Biol Chem*, 1998, 273(21): 12817~12826[DOI]
- 23 Miura T, Hori-I A, Mototani H, et al. Raman spectroscopic study on the copper(II) coordination mode of Prion octapeptide and its pH dependence. *Biochemistry*, 1999, 38(35): 11560~11569[DOI]
- 24 Yamaura K, Okumura Y, Ozaki A, et al. Flow-induced crystallization of Bombyx-mori L. silk fibroin from regenerated aqueous-solution and spinnability of its solution. *Applied Polymer Symposia*, 1985, 205~220
- 25 Magoshi J, Magoshi Y, Nakamura S. Physical properties and structure of silk: 10. The mechanism of fibre formation from liquid silk of silkworm *Bombyx mori*. *Polymer Communications*, 1985, 26(10): 309~311
- 26 谢桐, 周平, 邓风, 等. pH 值对丝素蛋白构象转变的影响. *高等学校化学学报*, 2004, 25(5): 961~965

(2004-12-02 收稿, 2005-01-20 收修改稿)