

DOI:10.19431/j.cnki.1673-0062.2022.03.012

人工神经红蛋白的亚硝酸盐还原酶活性研究

董 硕,董 钊,孔祥君,林英武,杜可杰*

(南华大学 化学化工学院,湖南 衡阳 421001)

摘 要:为更好地探究神经红蛋白血红素铁配位情况改变对亚硝酸盐还原酶活性的影响,以神经红蛋白作为血红素蛋白模型分子,在其远端引入甲硫氨酸。通过紫外-可见分光光度计动力学以及电子顺磁共振波谱等方法研究,其亚硝酸盐还原酶活性的二级速率常数 k_{nitrite} 从0.44 L/(mol·s)提高到487 L/(mol·s)。结果表明,血红素口袋结构对蛋白的亚硝酸盐还原酶活性有较好的调节作用。

关键词:亚硝酸盐还原酶;神经红蛋白;甲硫氨酸

中图分类号:0641.4 **文献标志码:**A

文章编号:1673-0062(2022)03-0083-06

Rational Design of Neuroglobin to Regulate Nitrite Reductase Activity

DONG Shuo, DONG Yue, KONG Xiangjun, LIN Yingwu, DU Kejie*

(School of Chemistry and Chemical Engineering, University of South China,
Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: To better understand the effect of the heme coordination state for nitrite reductase activity, this study used neuroglobin as a model heme protein by introducing one distal methionine. UV-vis kinetic studies, combined with EPR studies, showed that rate constant k_{nitrite} increased from 0.44 L/(mol·s) to 487 L/(mol·s). Thus, the results show that the heme pocket may regulate nitrite reductase activity of neuroglobin.

key words: nitrite reductase; neuroglobin; methionine

0 引 言

一氧化氮(NO)在哺乳动物各种生理和病理

过程中起着关键作用,这些过程大多涉及细胞间信号传导和细胞-母体响应^[1-2]。在体内主要由NO合成酶进行合成^[3]。对于哺乳动物来说,在

收稿日期:2022-01-10

基金项目:国家自然科学基金项目(21701081;21977042)

作者简介:董 硕(1995—),男,硕士研究生,主要从事人工酶催化方面的研究。E-mail:977732106@qq.com。*通信作者:杜可杰(1983—),男,副教授,博士,主要从事人工酶催化方面的研究。E-mail:alalike1983@163.com

缺氧条件下,NO合成酶活性下降,则依赖亚硝酸盐还原酶(nitrite reductase, NIR)将亚硝酸盐还原为一氧化氮(NO)^[4-7]。NIR广泛存在于自然界中,天然的NIR主要分为铜类亚硝酸盐还原酶(Cu-NIR)和血红素类亚硝酸盐还原酶(*cd*₁ NIR)两大类^[8-9],其中,血红素类蛋白中血红蛋白(Haemoglobin)、肌红蛋白(Myoglobin)、细胞色素c(Cytochrome c)、细胞色素bc₁(Cytochrome bc₁)以及线粒体电子传递链的细胞色素c氧化酶(Cytochrome c oxidase)等都有相关亚硝酸盐还原酶活性的报道^[10-11]。例如在人体中,通过血红蛋白的亚硝酸盐还原来调节血压、缺氧血管舒张、血小板活化和细胞对缺氧状态的适应等^[12-13]。

人的神经红蛋白(neuroglobin, Ngb)是本世纪初由德国科学家T. Burmester等人^[14]发现,作为一种典型的血红素蛋白,近年来其体外生物活性研究得到广泛关注^[4,15]。该蛋白拥有六配位b型血红素,轴向配位为His64/His96,其中His64可以被NO、O₂等小分子取代,因此展现一些如亚硝酸盐等生物活性。M. T. Gladwin等人^[10]发现Ngb血红素配位情况的改变会调控NIR活性,蛋白中心血红素位点空腔的变化会直接关系到NIR活性强弱,通过对46位点和55位点的人工设计形成稳定的五配位血红素中心,其NIR活性比野生型六配位活性中心的神经红蛋白要快近2 000倍。随后,该课题组对神经红蛋白突变体进一步研究发现^[12],将64位点进行突变为丙氨酸,得到具有更大活性空腔的五配位血红素中心的Ngb,其NIR活性远远高于之前报道过的Ngb。因此,Ngb的血红素中心的配位构型及其活性空腔对其生物活性起了较大的影响。通过理性设计将Ngb的64位点的组氨酸(His64)突变为甲硫氨酸(Met64)得到五配位Ngb^[16],同时为了减少Ngb分子间的二聚,将120位点突变为半胱氨酸(Cys),最终突变得得到H64M/C120S Ngb,并对其亚硝酸盐还原活性进行了研究。结果表明,突变体H64M/C120SNgb在低氧条件下同样表现出比WT Ngb更优秀的NIR活性。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

试剂:BL21(DE3)大肠杆菌、XL10 Gold菌质粒提取试剂盒(QIAGEN,德国)、连二亚硫酸钠

(阿拉丁,上海)、亚硝酸钠(阿拉丁,上海)。实验所用试剂均为分析纯。

仪器:紫外-可见分光光度计(UV-Vis, Agilent 8453)、液相色谱-质谱联用仪(LC-MS, Waters Xevo G2-XS QTof)、电子顺磁共振波谱仪(EPR, Bruker A300)等。

1.2 蛋白的表达与纯化

野生型神经红蛋白(WT Ngb)通过将包含Ngb基因的pET3a质粒导入到BL21(DE3)大肠杆菌中表达获得。其突变体H64M/C120S Ngb蛋白表达过程与前面过程一致。蛋白表达和纯化步骤参照之前的实验方法^[16],并作出适当调整,蛋白浓度通过吸光度计算得到,WT Ngb和H64M/C120 Ngb摩尔消光系数分别为 $\varepsilon_{413} = 129 \text{ L}/(\text{mmol} \cdot \text{cm})$ 、 $\varepsilon_{405} = 150 \text{ L}/(\text{mmol} \cdot \text{cm})$ 。

1.3 质谱表征

突变体蛋白质谱数据在电喷雾电离质谱仪上测得。将H64M/C120S Ngb样品脱盐处理后,与1%的甲酸(体积比为水:甲酸=99:1)混合,蛋白混合溶液转移到样品室,在正离子模式测量。使用软件MaxEnt1将多电荷峰处理得到蛋白质分子。

1.4 NIR活性研究

通过紫外-可见分光光度计检测在定量蛋白酶(10 $\mu\text{mol/L}$)存在并加入还原剂后的亚硝酸盐光谱变化,来表征蛋白酶的亚硝酸盐活性。该反应体系在常温(25 $^{\circ}\text{C}$)无氧条件下进行,缓冲体系采用磷酸盐缓冲液($\text{pH}=7.4$, 100 mmol/L),所有溶液使用前均充分除氧,并充入高纯N₂进行保护备用。将Ngb加入密封比色皿中除氧,用密封注射器依次添加2.5 mmol/L 连二亚硫酸钠和适当浓度梯度的亚硝酸钠溶液,立即监测亚硝酸盐还原前后的光谱变化。表观速率常数(k_{obs} , s^{-1})由脱氧神经红蛋白Q带的吸光度和时间拟合得到式(1)。

$$y = y_0 + ae^{-kt} \quad (1)$$

亚硝酸盐还原的分子速率常数(k_{nitrite} , $\text{L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$)由表观速率常数和亚硝酸盐浓度线性拟合得到。

1.5 电子顺磁共振波谱研究

还原态下WT Ngb及其突变体H64M/C120S Ngb波谱通过Bruker A300电子顺磁共振(electron paramagnetic resonance, EPR)波谱仪进

行检测。该反应在专用石英 EPR 管中进行,将 WT Ngb 或 H64M/C120S Ngb(0.15 mmol/L)与连二亚硫酸钠(30 mmol/L)混合,彻底除氧后通入高纯 N_2 ,再加入除氧 $NaNO_2$ (15 mmol/L),在 90 K 下检测其电子顺磁共振波谱图。

2 结果与讨论

2.1 突变体蛋白纯化及表征

为了对突变体蛋白 H64M/C120S Ngb 进行明确的表征,对其纯化后的样品进行了质谱测试。结果显示其分子量为 16 909.5 Da(图 1),与脱辅

基蛋白计算值相吻合,可以确定纯化所得蛋白即为目标蛋白,同时也说明采用的纯化方法适用于本突变体蛋白的纯化。在之前我们组的研究中发现,H64M/C120S Ngb 突变体蛋白相较于 WT Ngb 和 Cyt c,64 位点组氨酸(His)被蛋氨酸(Met)取代后自氧化形成 SO-Met,并进一步自氧化生产 SO_2 -Met^[16]。不同于野生型神经红蛋白的六配位情况,H64M/C120S Ngb 由于 Met 的引入,形成五配位结构,该五配位结构形成了一定的蛋白空腔,并且为蛋白活性中心的血红素铁中心结合外源氧化还原试剂或底物提供了条件。

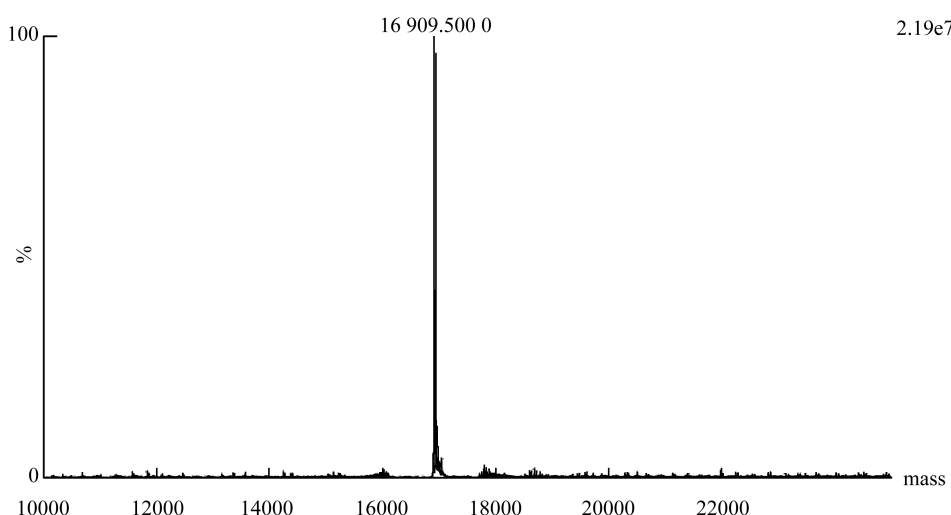


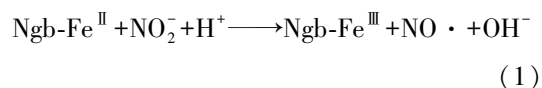
图 1 H64M/C120S Ngb 质谱图

Fig.1 Mass spectrum of H64M/C120S Ngb

2.2 亚硝酸盐还原酶活性研究

和其他血红素蛋白一样,神经红蛋白在厌氧条件下具有一定的亚硝酸盐还原酶活性。为了研究突变体蛋白 H64M/C120S Ngb 构象的改变对其亚硝酸盐还原酶活性的影响,在准一阶条件下测定了不同浓度 $NaNO_2$ 下的蛋白 NIR 活性研究。在过量 $Na_2S_2O_3$ 存在下,在加入 $NaNO_2$ 后,蛋白将亚硝酸盐还原,产生的 NO 结合到血红素铁中心,即还原状态的 Ngb 紫外-可见光谱由脱氧形式转变为 NO 结合状态。紫外-可见光谱图显示,无论是 WT Ngb 还是 H64M/C120S Ngb 在 557 nm 处均出现不同程度的降低(见图 2(a),(c)),WT Ngb 蛋白在 557 nm 处出现明显的下降。H64M/C120S Ngb 由于亚硝酸盐活性过快,因此,加入 $NaNO_2$ 测定立即测定,其在 557 nm 处的紫外吸收峰已经大幅度降低,这与 J. Tejero 等人之前的研

究结果一致^[12]。这说明六配位活性中心 WT Ngb 的活性依赖 His 的解离速率,而五配位 H64M/C120S Ngb 的不存在配位中心的解离,大大的提高了其亚硝酸盐还原速率。其亚硝酸盐的还原可以通过方程来表示:



通过对表观速率常数 k_{obs} 和 $NaNO_2$ 浓度进行线性拟合得到该蛋白还原亚硝酸盐的二级速率常数 $k_{nitrite}$ 。计算结果显示,突变体蛋白 H64M/C120S Ngb 的 $k_{nitrite}$ 达到了 487 L/(mol · s),远远高于天然神经红蛋白(WT Ngb)所显示的活性(0.44 L/(mol · s)),与文献中报道的数据(0.52 L/(mol · s))非常接近。结果显示通过对神经红蛋白血红素活性中心构象的改变,使 NIR 活性提

高了超过1 000倍(见图2(b),(d))。对目前报道的类似蛋白及其突变体的亚硝酸盐还原二级速率常数 k_{nitrite} 以进行横向对比(见表1),通过对比发现,双突变体H64M/C120S Ngb具有较高的活性,这说明五配位结构及64位的蛋氨酸的引入,能够显著增强其亚硝酸盐还原酶活性,但是由于

反应太快,导致 NaNO_2 加入后紫外-可见光谱的迅速变化,而且所有的反应是在无氧密闭的条件下进行,对反应紫外检测的速率提出来较大的挑战,目前快速停留分析光谱仪器不能进行无氧操作,如何精准测量无氧条件下的紫外-可见光谱变化是今后需要解决的重要问题。

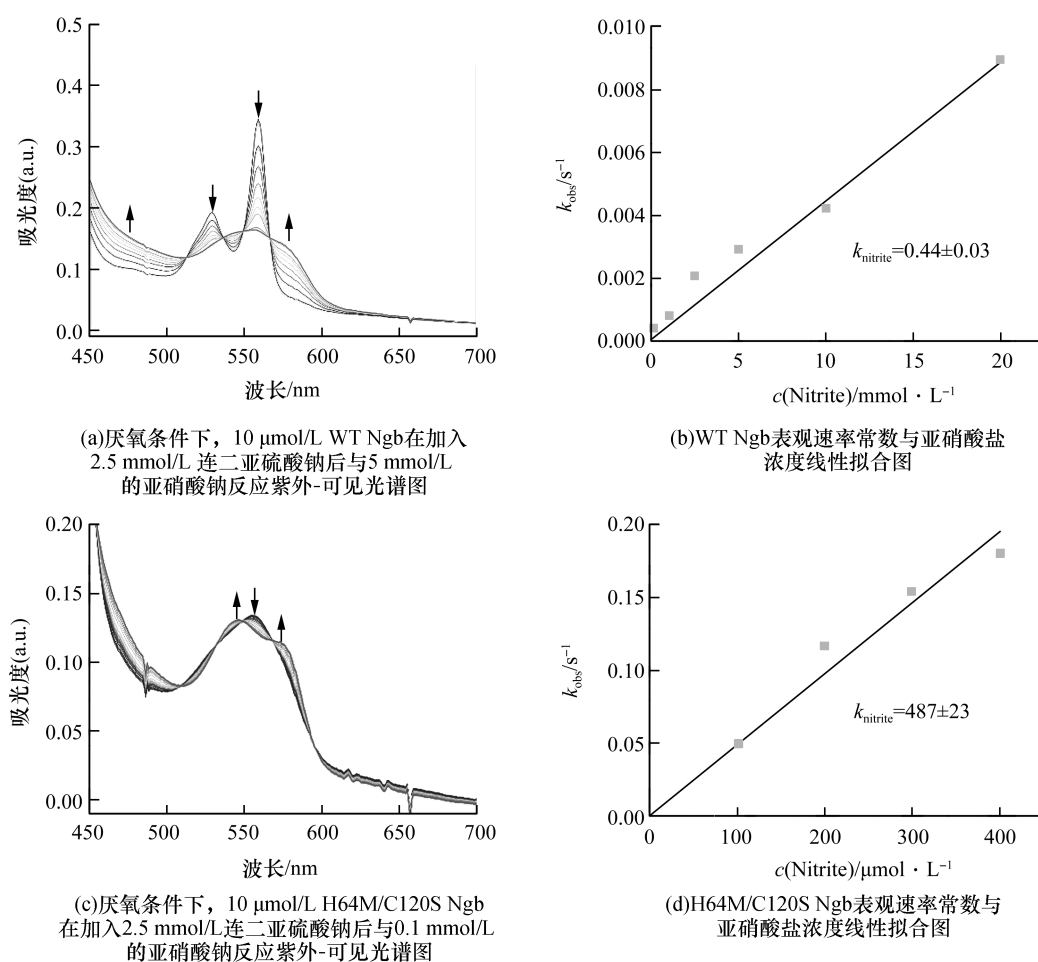


图2 WT Ngb 和 H64M/C120S Ngb 的亚硝酸钠反应紫外-可见光谱图以及表观速率常数与亚硝酸盐浓度的线性拟合图

Fig.2 UV-vis spectra of WT Ngb and H64M/C120S Ngb reacting with sodium nitrite and linear fitting diagram of apparent rate constant and nitrite concentration

2.3 EPR 研究

为了进一步提供 Ngb 及其突变体的亚硝酸盐还原的信息,对蛋白结合 NO 的复合物进行 EPR 研究。电子顺磁共振波谱图可以证明顺磁性物质亚硝酰基血红素铁的存在(见图3)。低温条件下(90 K),H64M/C120S Ngb 在还原亚硝酸盐时,形成了亚铁血红素结合 NO 独特的超精细的峰。H64M/C120S Ngb-NO ($g_{\perp} = 2.037$, $g_{\parallel} =$

1.981) 和 WT Ngb ($g_{\perp} = 2.034$, $g_{\parallel} = 1.980$) 均是 A 型裂分峰信号,即 NO 与蛋白中心 Fe 的键合方向是与卟啉分子平面垂直的。这与 M. Tiso 等人^[18]观察到的人的神经红蛋白亚硝酰基血红素铁 EPR 峰形一致。研究结果说明在还原条件下,H64M/C120S Ngb 中心铁原子可以与 NO 进行较好的结合。

表1 各血红素蛋白亚硝酸盐还原酶活性的

 k_{Nitrite} 比较Table 1 Comparison of k_{Nitrite} of heme protein nitrite reductase activity单位: $\text{L} \cdot (\text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$

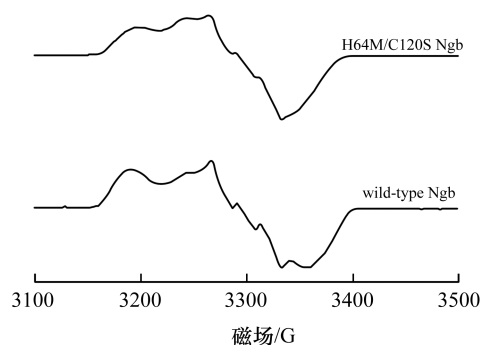
Protein	k_{Nitrite}
WT Ngb	0.44 ± 0.03 (本工作); 0.52 ± 0.19 ^④
H64M/C120S Ngb	487 ± 23 (本工作)
H64W Ngb	7.6 ± 1.3 ^④
H64Q Ngb	387 ± 21 ^④ ; 267 ± 16 ^②
H64L Ngb	259 ± 8 ^②
Horse heart Cyt c	0.073 ^①
Cardiolipin-bound Cyt c	2.6 ^①
Horse heart WT Mb	5.5 ^①
WT Mb	6.1 ± 0.4 ^②
H64A Mb	1.8 ± 0.3 ^②
F43H/H64A Mb	49.8 ± 1.5 ^③

①报道于 Ref. [17]。

②报道于 Ref. [18]。

③报道于 Ref. [19]。

④报道于 Ref. [12]。

图3 0.15 mmol/L 还原态下的 WT Ngb 和 H64M/C120S Ngb 与 15 mmol/L NaNO_2 反应得到的电子顺磁共振波谱图Fig.3 EPR spectra of NaNO_2 (15 mmol/L) reduction by WT Ngb and H64M/C120S Ngb (0.15 mmol/L)

3 结 论

本实验以人的 Ngb 为模型,在其轴向配位引入一个 Met,构建得到突变体蛋白 H64M/C120S Ngb,结果显示其亚硝酸盐还原速率常数 k_{nitrite} 为 $(487 \pm 23) \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$,比 WT Ngb 提高了近 1 000 倍。EPR 结果显示,NO 与血红素中心 Fe

以垂直于卟啉分子的方向进行结合,同时表明五配位血红素中心相对于六配位活性中心的血红素蛋白,在亚硝酸盐还原酶活性表达过程中,不需要经历配位点的解离,有利于亚硝酸盐还原酶的活性提高。

参考文献:

- [1] SASAKI D, WATANABE T F, EADY R R, et al. Reverse protein engineering of a novel 4-domain copper nitrite reductase reveals functional regulation by protein-protein interaction[J]. FEBS Journal, 2021, 288(1): 262-280.
- [2] LEHNERT N, KIM E, DONG H T, et al. The biologically relevant coordination chemistry of iron and nitric oxide: Electronic structure and reactivity[J]. Chemical reviews, 2021, 121(24): 14682-14905.
- [3] CARLSTROM M. Nitric oxide signalling in kidney regulation and cardiometabolic health[J]. Nature reviews nephrology, 2021, 17(9): 575-590.
- [4] 林英武. 血红素蛋白的亚硝酸盐还原酶功能及其生物学意义[J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(12): 1020-1025.
- [5] KRAFT B, JEHLICH N, LARSEN M, et al. Oxygen and nitrogen production by an ammonia-oxidizing archaeon[J]. Science, 2022, 375(6576): 97-100.
- [6] KAPIL V, KHAMBATA R S, JONES D A, et al. The noncanonical pathway for in vivo nitric oxide generation: The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway[J]. Pharmacological reviews, 2020, 72(3): 692-766.
- [7] BEAS J Z, VIDEIRA M A M, SARAIVA L M. Regulation of bacterial haem biosynthesis[J]. Coordination chemistry reviews, 2022, 452: 214286.
- [8] ANDORALOV V, SHLEEV S, DERGOUSOVA N, et al. Octaheme nitrite reductase: The mechanism of intramolecular electron transfer and kinetics of nitrite bioelectroreduction[J]. Bioelectrochemistry, 2021, 138: 107699.
- [9] EADY R R, SAMAR HASNAIN S. New horizons in structure-function studies of copper nitrite reductase[J]. Coordination chemistry reviews, 2022, 460: 214463.
- [10] GLADWIN M T, KIM D B. The functional nitrite reductase activity of the heme-globins[J]. Blood, 2008, 112(7): 2636-2647.
- [11] ALI M, STEIN N, MAO Y, et al. Trapping of a putative intermediate in the cytochrome c nitrite reductase (cc-NiR)-catalyzed reduction of nitrite: Implications for the ccNiR reaction mechanism[J]. Journal of the American chemical society, 2019, 141(34): 13358-13371.
- [12] TEJERO J, SPARACINO C E, RAGIREDDY V, et al.

- Exploring the mechanisms of the reductase activity of neuroglobin by site-directed mutagenesis of the heme distal Pocket[J]. *Biochemistry*, 2015, 54(3):722-733.
- [13] LI X, ZHUGE Z, CARVALHO L, et al. Inorganic nitrate and nitrite ameliorate kidney fibrosis by restoring lipid metabolism via dual regulation of AMP-activated protein kinase and the AKT-PGC1 α pathway[J]. *Redoxbiology*, 2022, 51:102266.
- [14] BURMESTER T, WEICH B, REINHARDT S, et al. A vertebrate globin expressed in the brain[J]. *Nature*, 2000, 407(6803):520-523.
- [15] 林英武. 血红素蛋白二聚 寡聚与多聚[J]. *化学进展*, 2014, 26(6):987-995.
- [16] HAI-XIAO L, LIANZHI L, BO H, et al. Neuroglobin is capable of self-oxidation of methionine64 introduced at the heme axial position[J]. *Dalton transactions*, 2018, 47(32):10847-10852.
- [17] ASCENZI P, MARINO M, POLITICELLI F, et al. Cardiolipin modulates allosterically the nitrite reductase activity of horse heart cytochrome *c*[J]. *Journal of biological inorganic chemistry*, 2014, 19(7):1195-1201.
- [18] TISO M, TEJERO J, BASU S, et al. Human neuroglobin functions as a redox-regulated nitrite reductase[J]. *Journal of biological inorganic chemistry*, 2011, 286(20):18277-18289.
- [19] WU L B, YUAN H, GAO S Q, et al. Regulating the nitrite reductase activity of myoglobin by redesigning the heme active center[J]. *Nitric oxide*, 2016, 57:21-29.
-
- (上接第53页)
- [13] 龚囡, 赵坤, 包涵, 等. 红砂岩蠕变破坏声发射震源演化及其分形特征[J]. *岩土力学*, 2021, 42(10):2683-2695.
- [14] MANSOURI H, AJALLOEIAN R. Mechanical behavior of salt rock under uniaxial compression and creep tests[J]. *International journal of rock mechanics and mining sciences*, 2018, 110:19-27.
- [15] 舒和平. 黄土丘陵地区小流域泥石流形成与运动特征模拟研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2019:78-79.
- [16] 舒和平, 齐识, 宁娜, 等. 甘肃省南部武都区泥石流灾害风险评估研究[J]. *自然灾害学报*, 2016, 25(6):34-41.
- [17] ODLING N E. Natural fracture profiles, fractal dimension and joint roughness coefficients[J]. *Rock mechanics and rock engineering*, 1994, 27(3):135-153.