

蛋白质溶液小角散射方法和 天线膜蛋白 LH2 的低分辨形状研究*

洪新国^{1;1)} 翁羽翔² 李明²

1 (中国科学院高能物理研究所 北京 100039)

2 (中国科学院物理研究所软物质实验室 北京 100080)

摘要 应用溶液小角散射技术,测定了在清洁剂溶液中细菌捕光天线色素蛋白(LH2)的小角散射.使用椭球体形散函数对散射曲线进行直接的曲线拟合,并以球谐函数展开的 *ab initio* 低分辨形状测定等方法来研究 LH2 的低分辨形状.结果表明 LH2 蛋白分子在清洁剂溶液中的单分子具有椭球结构.与环状 9 对称的晶态结构不同,变形的 LH2 的椭球偏心率与单分子光谱学对孤立的 LH2 单分子测量结果一致.

关键词 X 射线散射 蛋白质结构 光合膜蛋白 溶液散射 低分辨率形状

1 引言

生命科学是研究各种生命现象及其本质的科学,蛋白质分子的结构和功能是当前国际上热门研究领域之一.最近利用溶液 X 射线散射技术在重构蛋白质分子形状包络方面取得了显著的进展^[1-3].通过对散射曲线进行球谐函数展开^[4-6]或用哑元原子模型来模拟^[7-8],可以获得溶液中蛋白质分子及其复合物的低分辨形状.蛋白质分子结构的包络或构形模型的立体参数可以通过一种与模型无关方式来确定,而无需利用晶体结构坐标来描述.其特点是不需生长蛋白质单晶,只通过蛋白质溶液的小角散射就可以确定形状包络,从而极大地克服了生长生物大分子晶体的困难.这一方法已经成功地对于一些溶液中的蛋白质提供了稳定而唯一的重构形状^[7-9],逐渐被多个结构生物学实验室所采纳,是国际上公认的有效方法^[10].

自然界中光合作用的基本过程是通过捕光天线系统吸收光子,随后迅速而有效地将能量转移到光合反应中心(RC),在这里电荷发生分离,能量变成可利用的化学能.相比于其他的光合有机体,紫细菌是相对地简单.在大多数紫细菌物种(如

Rhodobacter (Rb.) *sphaeroides*, *Rhodospseudomonas* (Rps.) *acidophila*, 和 *Rhodospirillum* (Rs.) *molischianum*)之中,光合膜中包含着二类天线蛋白,即捕光天线蛋白 LH1 和 LH2. LH1 是围绕在反应中心(RC)外层的,而 LH2 是更外围的蛋白质,它将能量传输到 LH1^[11-13].1995 年英国科学家 Cogdell 等确定了由红假单胞菌(*Rhodospseudomonas acidophila*)中提取的外周光合天线色素蛋白复合体 LH2 的晶体结构^[14,15].他们证明了紫色细菌的 LH2 蛋白质的结构具有很高的对称性,具有由 9 个 $\alpha\beta$ -二肽确定的 9 次旋转轴.基本构建单元是蛋白质 $\alpha\beta$ -二肽,它结合 3 个细菌叶绿素(Bchl)分子和一个类胡萝卜素分子.总共 27 Bchl a 形成 $\alpha\beta$ -二肽支撑的 C9 对称的空心环状体.9 个 Bchl a 环的色素间隔较大(称为 B800),另外的 18 Bchl a 色素间隔较短(称为 B850).在 Rs. *Molischianum* 中,人们发现一个相似结构的 LH2 蛋白,但是只有 8 重对称性,它包含 16 个 B850 分子和 8 个 B800 分子.随着高分辨率结构知识的获得和超快激光光谱学的出现,初级的光合过程在光捕获系统成为一个目前光合研究中最热门的课题之一^[16].

近年来,不同的谱学方法包括超快激光光谱学

* 国家重点基础研究和发计划(G1998010102),国家自然科学基金(10375075)资助

1) E-mail: hongxg@ihep.ac.cn

和单分子光谱学被用于阐明 LH2 中高效的能量传输功能与它的独特的对称性的关系. 超快激光光谱学揭示了在 B850 环中处于激发态的 Bchl a 的激发能在整个环中是非局域. 最低激发态是光学禁止的, 不会产生荧光, 从而在 B850 环中能量得以贮藏, 直到所保存的激发能传递到邻近的环并最终传到光合反应中心 (RCs). 这一过程的总量子效率高 95%^[17]. 单分子光谱学的显著优点是在消除整体平均效应后能探测到一些在块体中所不能显现的重要光学特性^[18]. 通过将 LH2 固定在 300K 的云母表面上, 单分子极化依赖荧光研究首次揭示 LH2 分子是椭圆形的吸收体和发射体, 指出晶态 LH2 的高度对称性在孤立分子态不显现^[19]. 最近用极化荧光激发谱对低温 (1.2K) 下固定在 PVA 矩阵中单个 LH2 分子的研究表明 B850 环在孤立状态下存在着某种结构变形. 进一步的模拟显示孤立 LH2 分子变形从 C9 对称的环到的一个 C2 对称的具有偏心率为 0.52 的椭圆^[20-22]. 显然, 在近似于膜环境的清洁剂溶液中, LH2 分子的究竟是椭圆还是 C9 对称的圆筒状结构是一个值得深入研究的问题^[21]. 然而迄今为止, 所有关于 LH2 蛋白变形的迹象都是源于单分子光谱学研究, 直接的结构证据是十分必要.

本文报道通过同步辐射小角 X 射线散射 (SAXS) 来研究 LH2 分子在清洁剂溶液中的低分辨率形状, 它提供了 LH2 在清洁剂溶液中是否为椭圆状结构的直接证据.

2 实验

光合细菌捕光天线膜蛋白 LH2 的制备如下: 用 1% 的 N,N 二甲基十二烷基氧化胺 (N,N dimethyldodecylamine N-oxide (LDAO)) 溶解红球菌种 2.4.1 载色体, 在 DE52 离子交换柱上用氯化钠溶液分级洗脱分离并纯化 LH2 膜蛋白分子^[23].

小角散射实验完成于 BSRF 的 4B9A 束线的 SAXS 实验站^[24]. 入射 X 射线的波长是 1.54Å, 采用成像板技术记录散射 X 射线的强度. 散射矢量可表示为 $h = 4\pi\sin\theta/\lambda$, 这里 2θ 是散射角. 成像板是富士公司的 BAS-2500 成像板 (IP) 系统, 其有效范围是 400mm × 200mm 和最小像素大小是 50μm. 样品到探测器的距离是 1550mm, 可覆盖散射矢区间为 $0.01 < h < 0.25\text{Å}^{-1}$. 样品散射强度是从总的测量强度中扣除背底散射, 并进行吸收校正. 蛋白

溶液样品是密封在 2 个平行薄膜所形成的空隙中. 典型的数据采集时间是 5—10 分钟, 依赖于散射强度的大小. 通过蒸馏水调节 LH2 的浓度, 使在 850 nm 波段处 1.0cm 光程的光学密度等于 3.0 ($OD_{850nm} = 3.0$). SAXS 测量所用样品, 进一步用蒸馏水按比例 1:1, 1:5, 1:10 和 1:50 进一步稀释.

3 结果和讨论

蛋白质溶液的小角散射可用下式表述,

$$I_{\text{Solution}}(h) = I_{\text{Solvent}}(h) + I_{\text{Protein}}(h). \quad (1)$$

通过分别测定蛋白质溶液的散射 $I_{\text{Solution}}(h)$ 和溶剂散射 $I_{\text{Solvent}}(h)$, 其差值即为蛋白质分子的散射 $I_{\text{Protein}}(h)$. 在低分辨率形状重构方面, 德国科学家 Stuhrmann 首先提出, 在极坐标中粒子形状可以用一包络角函数 $F(\theta, \varphi)$ 来表示^[30], 即:

$$\rho(r) = 1, 0 \leq r \leq F(\theta, \varphi); \rho(r) = 0, 0 \leq r \leq F(\theta, \varphi). \quad (2)$$

式中 $F(\theta, \varphi)$ 称为包络函数, 用来描述分子包络的边界. 在边界内粒子密度 $\rho(r)$ 是均匀的一个定值, 但是边界外为零. 包络函数 $F(\theta, \varphi)$ 可以展开为一系列球谐函数 $Y_{lm}(\theta, \varphi)$ ^[31],

$$F(\theta, \varphi) = R_0 \sum_{l=0}^L \sum_{m=-l}^l f_{lm} Y_{lm}(\theta, \varphi), \quad (3)$$

式中 f_{lm} 是多极系数和 L 为多极阶数. R_0 是一尺度因子 [$\sim (3V/4\pi)^{1/3}$], V 是粒子的体积. 此外,

$$Y_{lm}(\theta, \varphi) = \left[\frac{(2l+1)(l-m)!}{4\pi(l+m)!} \right]^{1/2} P_l^m(\cos\theta) \exp(im\varphi), \quad (4)$$

这里 $P_l^m(\cos\theta)$ 是连带 Legendre 函数 (变量 $\cos\theta$). l 和 m 是整数, 且 $-l \leq m \leq l$. 四极项与零极项的比率 $5^{1/2} |f_{20}|/f_{00}$ 是粒子偏离球状形状的一个指标. Svergun 及和作者对此方法进行了极大的发展, 通过最小化实验散射曲线与拟合实验曲线的残差, 发展出一套计算多极系数的程序^[4], 其中算法细节可参阅文献^[6]. 总之, 在随机方向粒子组成的单散系统中, 从小角散射数据可以获得粒子的结构信息, 即从测得的一维散射曲线, 用一组多极系数重构粒子的三维形状. 基于这些多极系数, 人们可以为所测定大分子的形状构建一近似模型^[6,30].

一般来说, 在形状描述中, 实验上可获得的散射数据的范围允许确定 15—20 变量. 这给多极阶数 L 强加了一个上限, 因为独立参数是等于 $(L+1)^2 - 6$. 因而, 在通常唯一形状的推定中, 可能的多极阶

数是 $L = 4$. 另外, 分子的对称征增加了对多极系数 f_{lm} 限制, 可以减少所需计算参数的数目, 即用 $L = 5, 6$ 或 7 , 从而可以改善形状重构的可靠性. 对称越高, 越多的多极系数可以忽略, 因而导致分辨率的提高. 本文中, 假定分子具有两重对称轴, 分子形状分析用 $L = 4$ 的球谐数描述. 然而, 我们发现不合适的计算参数和散射强度在高角度处的统计误差对形状重构的唯一性存在明显的影响. 为了减小这种不确定性, 首先我们直接用一个椭圆体来拟合实验散射曲线, 目的是发现溶液中 LH2 分子散射体究竟是长棒状还是圆盘状. 在单散系统中, 具有半轴 a, a, wa 的椭圆体分子的散射强度 $I(h)$ 可以表示为

$$I(h) = I_e N n^2 \left[\int_0^{\frac{\pi}{2}} \phi^2 (ha \sqrt{\cos^2 \theta + \omega^2 \sin^2 \theta}) \cdot \cos \theta d\theta \right], \quad (5)$$

这里函数 $\phi(x) = 3(\sin(x) - x \cos(x))/x^3$. 对扁长或棒状散射体可以看成是一个扁长的椭圆体, 具有 $\omega > 1$; 对于球状散射体, $\omega = 1$; 圆盘状散射体, $\omega < 1$. 通过方程(5)对实验数据的直接拟合可以得到散射体的形状因子 ω . 曲线拟合只到 0.17 \AA^{-1} 以避免高角度处的噪音对结果的影响. 得到椭圆体的半轴 $a = 51.3 \text{ \AA}$, 和 $\omega = 0.31$ (结果见图 1), 这表明椭圆体散射体的形状是一扁平盘状. 这些结构参数可以作为先验知识用于在下面的结构重构中选取合适的初始参数.

$P(r)$ 是粒子的偶距离分布函数, 度量了蛋白质内原子矢量长度出现的频率. 该函数对于蛋白内的总体不对称性和域结构十分地敏感. 采用直接 Fourier 变换方法来计算 $P(r)$,

$$P(r) = \frac{1}{\pi} \int_0^{\infty} rh I(h) \sin 2\pi rh dh, \quad (6)$$

式中 $I(h)$ 是散射的实验数据. 图 2 利用(3)式计算得到的在清洁剂溶液中 LH2 蛋白质的 $P(r)$ 曲线. 为了比较, 其中实线实验数据变换而来, 而虚线表示假定 LH2 蛋白质在 C9 圆柱状对称条件下的理论偶分布函数^[27]. 计算中所需模型的坐标从蛋白质数据库 (PDB 1KZU) 得到. 可以看见 LH2 蛋白质在清洁剂溶液中的 $P(r)$ 明显地不同于柱状对称的情况, 溶液中 $P(r)$ 主峰变宽并具有一非对称形状, 粒子最大尺寸是 95 \AA . 这一数值可以作为在间接 Fourier 变换程序 GNOM 中的最大粒子尺寸 Dmax 的输入参数^[28,29]. 值得注意的是不适当的输入值能导致十分奇怪的 $P(r)$. 通过使用 GNOM, 获得结构的参数: $R_g = 32.2 \text{ \AA} \pm 1\%$, Dmax (最大的粒子维) = 95 \AA

$\pm 4\%$ 和 V (粒子体积) = $37\,000 \text{ \AA}^3 \pm 5\%$.

如图 3 所示, 计算的散射强度曲线与实验数据符合得相当好, 而用环状结构的 LH2 所计算得到的散射曲线明显地偏离实验结果. 图 4 表示所得到的分子形状包络在三正交方向的视图, 晶态结构也重叠在上面以便相比较. 图 4 中 (虚线) 表示通过重构包络所获得的 LH2 蛋白质的结构, 这一重构形状的理论散射曲线表示在图 3 中 (虚线). 包络测定所得到的椭圆盘近似有 40 \AA 厚, 85 \AA 宽和 110 \AA 长. 虽然这一方法的解由于高散射角处明显的噪音存在是不太稳定, 但是所获得形状是与方法模拟退火算法所得到的结果相当一致^[32], 因而可提供在清洁剂溶液中 LH2 蛋白质的确切的椭圆形状信息.

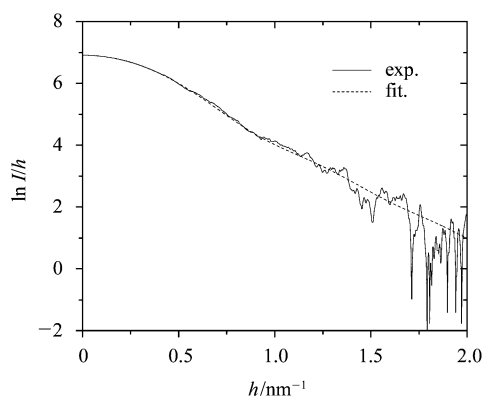


图 1 LH2 小角散射实验数据和理论拟合

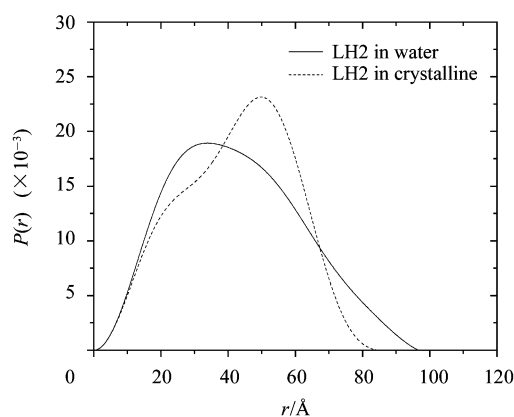


图 2 水溶液中 LH2 蛋白的偶距离分布函数 $P(r)$ (实线) 和圆柱状 C9 对称的 $P(r)$ (虚线)

LH2 分子是一完整的膜蛋白质, 它是用合适的清洁剂从脂质膜中分离出来的. 在清洁剂溶液中, 通常认为蛋白是包围在蛋白疏水区外由清洁剂分子所形成的“带子”中^[2,3,33]. 纯化后, 胶囊封装的膜蛋白质能结晶, 在晶态中发现了假定只在溶液中存在的清洁剂相^[36,37]. X 射线衍射所获得的原子分

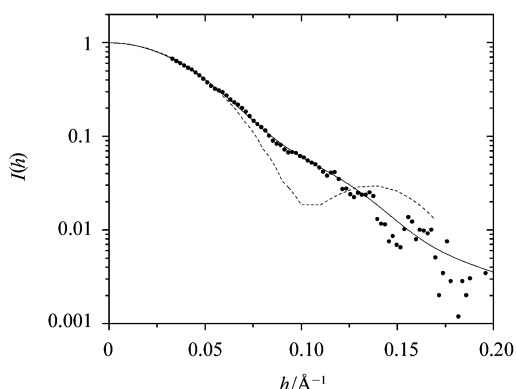


图 3 散射曲线的实验和理论拟合结果
实验(实心圆),用再构包络拟合(实线),及用 CRYSOL
对 LH2 模型的计算散射强度^[29](点线)。

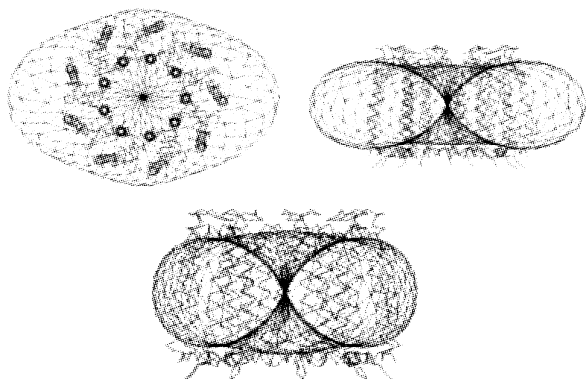


图 4 LH2 膜蛋白的形状包络(虚线)叠加
对应的晶态结构模型(在 3 个正交方向显示)

分辨率的 LH2 蛋白质的晶态结构可以用 2 个同心的洞圆筒描述. 外筒壁由 9 个 β 脱辅基蛋白螺旋组成, 其直径 68\AA ; 内筒壁由 9 个 α 脱辅基蛋白螺旋组成, 其直径 36\AA ; 圆筒的高度是 40\AA . 然而晶体中由于清洁剂相的无序特性, 不能为 X 射线晶体衍射所发现. 最近通过中子衍射方法测定了清洁剂外壳 β -octyl-glucoside (β OG) 在 LH2 晶态^[34]. 这一实验结果表明, 绕外墙壁疏水的 β -多肽的清洁剂带子的最大厚度是 15\AA . 对于完全伸展的 β OG 分子, 总数长度是 15.4\AA , 清洁剂带子一致于 LH2 的疏水表面用亲水的外向连接着清洁剂单分子层. 这一事实也支持早先提出的在溶液中膜蛋白质的清洁剂构造, 这里清洁剂是绕在疏水域的单层^[35]. 2 个清洁剂 β OG 和 LDAO 分子的伸展长度是相似的, 前者的长度是 15.4\AA , 后者的长度大约是 $15\text{--}16\text{\AA}$. 因此在溶液中预期的 LDAO 包围的 LH2 环将具有最大的直径 98\AA , 而清洁剂填充内部的空洞, 高度为 40\AA . 与

清洁剂包围的 LH2 晶态结构相比, 由 SAXS 测定的清洁剂封装的 LH2 环变形到椭圆体具有长轴 110\AA , 短轴 85\AA 对于用多级展开方法. 两种方法都给出 LH2 圆筒的高度是 40\AA , 等同于 LH2 圆筒在晶态的高度. 考虑清洁剂单层外壳的厚度是均匀地围绕在 LH2 蛋白质的周围, 如此的变形只能是源于蛋白质框架结构的扭曲. 除去清洁剂单层, 可以得到溶液中 LH2 的椭圆结构, 其长轴 80\AA , 短轴 55\AA . 形变环的偏心率 ε 定义为 $\varepsilon = (1 - a^2/b^2)^{1/2}$, a 和 b 分别是短轴和长轴. 模拟退火算法得到模型的偏心率是 0.59 . 这结果与单分子光谱学实验是很好地一致, 它发现单个变形椭圆形 LH2 分子的偏心率 $\varepsilon = 0.52$, 相应的短轴与长轴之比是 0.85 ^[20]. 值得注意的是胶束封装的 LH2 的厚度几乎与晶态结构的高度一样, 表明在 N 和 C 端面几乎没有清洁剂单层. 这可能是残余的亲水的氨基酸在椭圆盘两面暴露在溶剂中. 已经知道 C 端有 18 带正电荷的赖氨酸, 2 个赖氨酸联接一个 α 肽, 而 LH2 域主要是负电荷因为存在 27 个谷氨酸^[19], 在没有清洁剂的帮助下他们是能直接溶解的.

我们的结果清楚地显示 LH2 蛋白质的结构发生了从晶态的环状结构到在清洁剂溶液中椭圆体的变形. 对于解释这一对称性的降低变形, 正如 Oijen 等人所提出, 是由于在晶态 LH2 分子是紧密地堆积, 从而产生结构的稳定性, 但是在溶液中这样的稳定力量是不在的^[20].

4 结论

应用同步辐射小角散射, 我们研究了细菌捕光天线色素蛋白 (LH2) 在清洁剂溶液中的低分辨率形状. 通过分别使用椭球体形散函数对散射曲线进行直接的曲线拟合和球谐函数展开 *ab initio* 形状测定方法, 结果清楚地表明 LH2 蛋白分子在清洁剂溶液中的单分子具有椭球结构. 与环状 9 对称的晶态结构不同, 变形的 LH2 的椭球偏心率与独立研究的单分子光谱学对孤立的 LH2 单分子测量结果一致.

作者感谢冼鼎昌教授、麦振洪教授和胡天斗研究员对本研究的支持, 感谢 Y. Koyama 教授和 Koyama 博士, R. Fujii 博士在样品制备方面的帮助. 感谢吴忠华博士、陈中军在实验方面的帮助和高能所创新基金在小角散射实验方面的支持.

参考文献 (References)

- 1 Mayor U, Guydosh N R, Johnson C M et al. *Nature*, 2003, **421**: 863—867
- 2 Sardet C, Tardieu A, Luzzati V. *J. Mol. Biol.*, 1976, **105**:383—407
- 3 Osborne H B, Sardet C, Michel-Villaz M et al. *J. Mol. Biol.*, 1978, **123**:177—206
- 4 Svergun D I. *J. Appl. Cryst.*, 2000, **33**:530—534
- 5 Svergun D I, Stuhrmann H B. *Acta Cryst.*, 1991, **A47**:736—744
- 6 Svergun D I, Volkov V V, Kozin M B et al. *Acta Cryst.*, 1996, **A52**: 419—426
- 7 Grossmann J G, Hasnain S S. *J. Appl. Cryst.*, 1997, **30**:770—775
- 8 Ockwell D M, Hough M A, Grossmann J G et al. *Acta Cryst.*, 2000, **D56**: 1002—1006
- 9 HAO Q. *Acta Cryst.*, 2001, **D57**:1410—1414
- 10 LNLS Activity Report, 2001
- 11 van Grondelle R, Dekker J P, Gillbro T et al. *Biophys. Acta.*, 1994, **1187**: 1
- 12 Pullerits T, Sundström V. *Acc. Chem. Res.*, 1996, **29**:381—389
- 13 Fleming G R, van Grondelle R. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1997, **7**:738
- 14 McDermott G, Prince S M, Freer A et al. *Nature*, 1995, **374**: 517—521
- 15 Freer A, Prince S, Sauer K et al. *Structure*, 1996, **4**:449
- 16 Sundström V, Pullerits T, van Grondelle R. *J. Phys. Chem. B.*, 1999, **103**:2327—2346
- 17 HU X, Schulten K. *Phys. Today*, 1997, **50**: 28—34
- 18 XIE S, Trautman J K. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 1998, **49**: 441—480
- 19 Bopp M A, Sytnik A, Howard T D et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1999, **96**:11271—11276
- 20 Antoine M, van Oijen A M, Ketelaars M et al. *J. Science*, 1999, **285**:400—402
- 21 Ketelaars M, van Oijen A M, Matsushita M et al. *Biophys. J.*, 2001, **80**:1591—1603
- 22 Matsushita M, Ketelaars M, van Oijen A M et al. *Biophys. J.*, 2001, **80**:1604—1614
- 23 Ohashi N, Kochi N, Kuki M et al. *Biospectroscopy*, 1996, **2**:59—69
- 24 Dong B Z et al. *J. Appl. Crystallogr.*, 1997, **30**:877
- 25 Guinier A, Fournet G. John Wiley & Sons: London, 1955
- 26 Glatter O, Kratky O. Academic Press, New York, 1982
- 27 Svergun DI, Barberato C, Koch M H. *J. Appl. Crystallogr.*, 1995, **28**:768—773
- 28 Semenyuk A V, Svergun D I. *J. Appl. Cryst.*, 1991, **24**:537—540
- 29 Svergun D I. *J. Appl. Cryst.*, 1992, **25**: 495—503
- 30 Stuhrmann H B. *Acta Cryst.*, 1970, **A26**:297—306
- 31 Press W H, Teukolsky S A. 1992, University Press, Cambridge
- 32 HONG Xin-Guo, WENG Yu-Xiang, LI Ming, Accepted by *Biophys. J.* (in press)
- 33 Roth M, Arnoux B, Dueruix A, Reiss-Husson, F. *Biochemistry*, 1991, **30**:9430—9413
- 34 Prince S M, Howard T D, Myles A A et al. *J. Mol. Biol.*, 2003, **326**:307—315
- 35 Le Maire M, Kwee S, Andersen J P, Moller J V. *Eur. J. Biochem.*, 1983, **129**:525—532
- 36 Roth M, Lewit-Bentley M, Michel H et al. *Nature*, 1989, **340**: 65—662
- 37 Roth M, Arnoux B, Dueruix A et al. *Biochemistry*, 1991, **30**: 9403—9413

Low Resolution Structure of Integral Membrane Protein Light-Harvesting Complex LH2 from Photosynthetic Bacteria in the Detergent Solution by Synchrotron Small-Angle X-Ray Scattering *

HONG Xin-Guo^{1,1)} WENG Yu-Xiang² LI Ming²

1 (Institute of High Energy Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

2 (Laboratory of Soft Matter Physics, Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract The low-resolution shape of the integral membrane protein light-harvesting complex LH2 from photosynthetic bacteria *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 in detergent solution has been determined from synchrotron small-angle X-ray scattering (SAXS) data using directly curve fitting by an ellipsoid and *ab initio* shape determination method of multipole expansion respectively. The results indicate that the LH2 proteins in aqueous solution has a shape of oblate plate. In contrast to the perfect symmetrical ring-like structure of LH2 in crystalline, the molecular shape of the LH2 complex in detergent solution clearly deviates from the ring-like crystal structure, which is consistent with the result of single molecular spectroscopy study of the isolated single LH2 molecules.

Key words integral membrane protein, small angle X-ray scattering, low resolution structure

* Supported by Major State Basic Research Development Program (G1998010102), NSFC (10375057)

1) E-mail: hongxg@ihep.ac.cn