

日本血吸虫硫氧还蛋白谷胱甘肽还原酶 SjTGR 的结构研究

吴群峰^{1,2}, 彭云¹, 黄符燕¹, 李攀¹, 范小林¹, 李永东^{1,2}, 周晓农²

(1 赣南师范学院/江西省有机药物化学重点实验室 江西赣州 341000

2 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所 中国上海 200025)

摘要: 日本血吸虫病是严重危害我国人民生命健康的传染性疾病。血吸虫生存于有氧环境, 需要有效的机制来维持细胞的氧化还原平衡及保证在寄生条件下对活性氧的清除能力。日本血吸虫 SjTGR 蛋白酶在抗氧化系统中是保持血吸虫细胞内氧化还原平衡的关键分子。研究表明, 血吸虫 TGR 是其生存所必需的基因, 采用 RNAi 技术干扰该蛋白酶的表达与活性, 将导致血吸虫的死亡。血吸虫 TGR 蛋白酶是一种理想的药物靶标蛋白, 解析其精细三维结构对于抑制剂药物的设计筛选具有重要的理论和应用价值。

本研究克隆了日本血吸虫 SjTGR 基因, 构建了该基因的表达载体并在大肠杆菌表达系统中实现了高效表达。我们对该蛋白进行了分离纯化和活性鉴定, 成功得到该蛋白酶与 FAD 的复合物晶体(图 1)并解析了它的晶体结构(图 2)。

SjTGR 蛋白酶表达结果显示其水溶液为橙黄色, 化学测定及结构解析结果均表明我们在大肠杆菌系统表达得到了 SjTGR-FAD 的蛋白复合物。其分子量约为 64 kDa, 该蛋白结晶条件筛选并成功得到该复合物的晶体。

SjTGR-FAD 结构解析结果显示非对称单元内具有两个蛋白分子, SjTGR 分子由谷氧还蛋白(Glutaredoxin, Grx)和硫氧还蛋白还原酶(Thioredoxin Reductase, TR)结构域构成的一种嵌合体结构。Grx 结构域具有典型的硫氧还蛋白折叠构型, 包含两个保守的 Cys(28 与 31 位)位于其氧化还原活性位点。结构中此两半胱氨酸残基约为 3.48 Å 彼此分开处于还原状态, 预计是结晶时加入巯基乙醇还原剂的缘故。TR 结构域与谷胱甘肽还原酶 GR 家族近似, 为由三个亚域构成的典型 TR 结构域折叠, 一是 N 末端 FAD 结合域(图 2 金色部分), 二是 NADPH 结合中心(图 2 绿色部分), 三是 C 末端形成二聚体接触部位(图 2 洋红色部分)。FAD 结合在 N 端一个长区域, 大多临近残基在 GR 蛋白酶家族中保守。腺嘌呤(Adenine)与一个接近 K399 和 E140 形成的极性口袋顶部结合, 异咯嗪(Isoalloxazine)环在残基 Y296 和 C154-C159 残基对间形成一个三明治状结构。

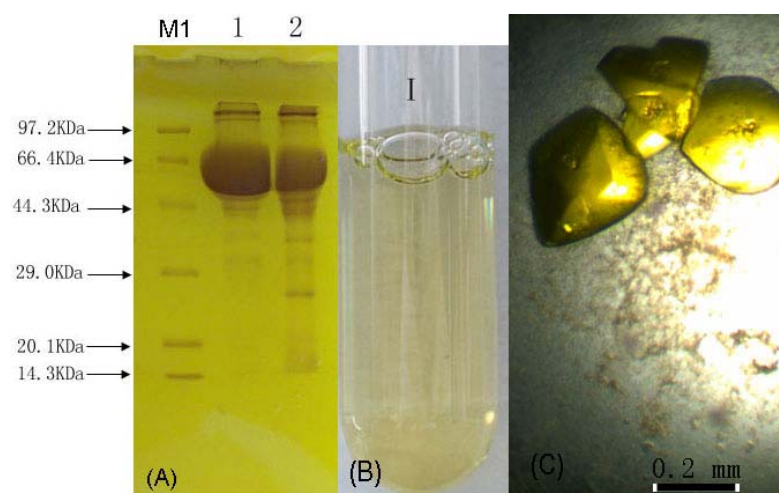


图 1. SjTGR 蛋白酶制备与结晶 (A) SDS-PAGE 电泳图; (B) 蛋白溶液 (C) SjTGR 晶体

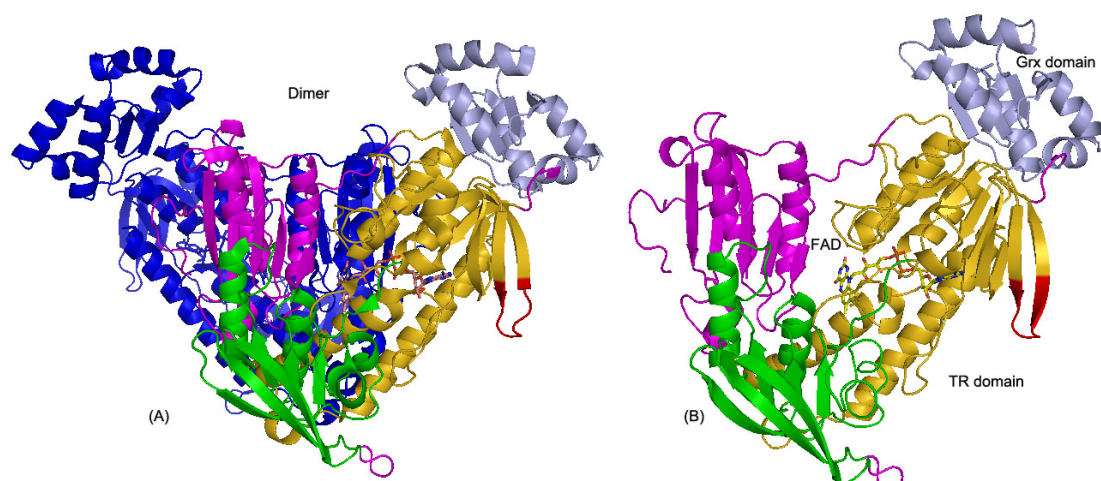


图 2. SjTGR 晶体结构 (A) 非对称单元二聚体分子; (B) 分子内结构域划分

关键词：日本血吸虫；硫氧还蛋白谷胱甘肽还原酶；晶体结构

基金项目：国家自然科学基金项目（31260206），博士后基金（2012M520352）

第一作者：吴群峰 男，硕士生，Email: wqf8811@163.com

***通信作者：**李永东 男，博士，副教授，E-mail: yqli2011@163.com

***通信作者：**周晓农 男，博士，教授，E-mail: xiaonongzhou1962@gmail.com