

镁离子转运蛋白 CorA 间质结构域删除分析

孙占华, 王世珍, 黄 萱, 许 森, 隋森芳

(清华大学 生物科学与技术系, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084)

摘 要: 为了研究 CorA 的镁离子转运机理, 对大肠杆菌 CorA 的间质结构域区进行了删除突变分析, 并利用酵母突变体互补技术进行了突变体活性测定。以酿酒酵母质膜镁离子转运系统敲除突变菌株 CM66 及其基因型对照菌株 CM52 为宿主菌, 建立了大肠杆菌 CorA 转运活性测定体系。结果显示: 大肠杆菌 CorA 间质结构域 N-端起始的 24 个残基对于 CorA 在酵母质膜中的表达或维持其本身正确构象发挥重要作用, CorA M¹²⁴ 到 D¹⁵⁴ 段的部分残基在 CorA 介导的镁离子转运过程中起到重要作用。

关键词: 分子生物物理学; 镁离子转运系统; 钴离子抗性等位基因 (CorA); 间质结构域; 删除分析

中图分类号: Q 615

文献标识码: A

文章编号: 1000-0054(2008)06-1057-05

Mutation analysis on periplasmic domain of magnesium transporter CorA

SUN Zhanhua, WANG Shizhen, HUANG Xuan, XU Miao,
SUI Senfang

(State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane
Biotechnology, Department of Biosciences and Biotechnology,
Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Deletion analysis of the periplasmic domain of *Escherichia coli* CorA was used to investigate the magnesium transport mechanism of CorA. An *E. coli* CorA transport activity assay platform was developed using the yeast mutant complement method. The host strains were CM66, a *Saccharomyces cerevisiae* strain with its plasma membrane magnesium transporter removed and CM52 which was the genotype control strain. The deletion results show that the N-terminal 24 residues of the CorA periplasmic domain are important for maintaining the proper structure of CorA and regulating CorA expression in yeast plasma membranes. Some of the residues between M¹²⁴ to D¹⁵⁴ have a very important impact on CorA mediation of the Mg²⁺ uptake process. This work describes the role of the CorA periplasmic domain in the magnesium transport process and gives the detail functions of various sections of PPD during this process.

Key words: molecular biophysics; magnesium transporter; cobalt resistance allele CorA; periplasmic domain; deletion analysis

CorA 是原核生物维持细胞镁离子平衡最为重要的镁离子转运系统之一^[1-2], 其同源蛋白广泛分布于真菌、酵母、植物和动物中。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 及鼠伤寒沙门氏杆菌 (*Salmonella typhimurium*) CorA 均编码由 316 个氨基酸残基组成的跨膜蛋白, 仅具 8 个氨基酸残基的差异^[3-4]。拓朴结构研究显示鼠伤寒沙门氏杆菌 CorA 可以分为 2 个结构域: 由约 235 个氨基酸残基组成的 N-端可溶性间质结构域(periplasmic domain, PPD) 和由 3 个穿膜 α 螺旋组成的 C-端跨膜结构域^[4-5], 且可能以同源寡聚体的形式来行使镁离子转运功能^[6]。

已有的工作证明: 大肠杆菌 CorA 的间质结构域片断具有 Mg²⁺、Ni²⁺、Co²⁺ 结合活性, 且其结合/解离常数同大肠杆菌全长 CorA 基本相同。上述试验证据均揭示: 在大肠杆菌 CorA 的间质结构域区存在着底物离子的特异性结合位点^[7-9]。

但目前人们对于 CorA-PPD 在 Mg²⁺ 转运过程中所起到的作用仍然所知甚少, 尤其是 PPD 区中可能参与底物结合和离子选择性的功能氨基酸残基。

考虑到 PPD 区本身保守性差的因素, 本研究设计构建了一系列 PPD 区的删除突变体, 且利用酿酒酵母质膜镁离子转运系统敲除突变体 CM66, 成功建立了 CorA 的 Mg²⁺ 转运活性测定的平台; 应用删除突变技术对 PPD 的各个片断在维持 CorA Mg²⁺ 转运活性中的作用进行了研究。

本文确定了 CorA 间质结构域中不同区段在转运过程中的具体功能以及可能与底物相互作用的残基。

收稿日期: 2007-05-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30340420442, 30330160);
国家“九七三”重点基础研究项目 (2004CB720005)

作者简介: 孙占华 (1980-), 男 (汉), 吉林, 硕士研究生。

通讯联系人: 隋森芳, 教授, E-mail: suisf@mail.tsinghua.edu.cn

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

1) 菌株。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)菌株CM 66(MATa *alr 1::HIS 3 alr 2::TRP 1 his 3-Δ200, ura 3-52, leu 2-Δ1, and lys 2-Δ202 trp 1-Δ63*)和CM 52(MATa *his 3-Δ200, ura 3-52, leu 2-Δ1, and lys 2-Δ202 trp 1-Δ63*)为突变体互补测定中使用的宿主菌。

2) 载体构建。以pYES2(Invitrogen)为空载体,利用*KpnI*和*XbaI*为5'和3'酶切位点插入野生型或删除突变的*CorA*基因(图1),所使用的引物参见表1。

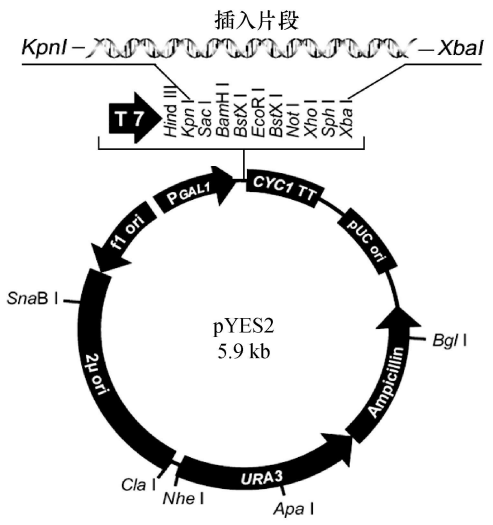


图1 大肠杆菌*CorA*删除突变质粒构建示意图

表1 大肠杆菌*CorA*删除突变中用于质粒构建的引物

名称	引物
pYES2- <i>CorA</i>	5-CCATAAGCTTAGCATGGTGAGCGCATTTCAAC-3 5-CCGCTCTAGATTATTACAACCAGTTCTTCCGC-3
pYES2- <i>CorANH</i>	5-GAGAAAGCTTATGGGCAGCAGCCATCATC 5-CCGCTCTAGATTATTACAACCAGTTCTTCCGC-3
pYES2- <i>CorACH</i>	5-GGAAGGTACCATGGGAAGCGCATTTTC-3
pYES2-24V	5-CCGTTCTAGATCAATGATGATGATGATG-3
pYES2-33D	5-GTCAGGTACCATGGTAAATGCAGTATGGATTG-3
pYES2-55E	5-TCTTGGTACCATGGACGACGACGAGCGACTGC-3
pYES2-71G	5-GGCAGGTACCATGGAAGTGAAGACATCGAAG-3
pYES2-93A	5-TGAAGGTACCATGGGCTGCATATTCACCTCTTC-3
pYES2-110A	5-TAACGGTACCATGGCATTACCATCCGTGATG-3
pYES2-124M	5-GCGTGGTACCATGGCTTTTCGTCTGTATCGTATG-3
pYES2-154D	5-TAGCGGTACCATGGTAGACGGTAACGCCTAC-3
pYES2-183D	5-AAATGGTACCATGGACCTGGAGCAGTTGAGCCG-3
pYES2-210G	5-ACTGGGTACCATGGGCTGGAAAGTTCCGCCTG-3
pYES2-224E	5-AGCGGGTACCATGGGTGGGCAACTGGAGCAGGC-3
通用反向引物	5-CCTGGGTACCATGGAATCCCTGCTGCCGC-3 5-ATCCTCTAGATCACAGCCAGTTCTTCCGCTTAAAG-3

1.2 试剂与培养基

1) 试剂。
TE: 100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 10 mmol/L EDTA;
LiAc: 1 mol/L LiAc, pH 5.2;
PEG: 100 mL 水加入 50 g PEG-4000;
TE/LiAc: 0.1 mL TE, 0.1 mL LiAc, 0.8 mL ddH₂O;
PEG/LiAc: 0.1 mL TE, 0.1 mL LiAc, 0.8 mL PEG。

2) 培养基。
Dropout 储液: 每100 mL 水加入下列氨基酸各100 mg: 腺嘌呤、精氨酸、半胱氨酸、亮氨酸、赖氨酸、苏氨酸、色氨酸; 及下列氨基酸各50 mg: 天冬氨酸、组氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、酪氨酸、缬氨酸;
YPDM: 100 mL 水中加入2 g 蛋白胨、1 g 酵母提取物、2 g D 葡萄糖、25 mmol MgCl₂, pH 5.8;
SDM 培养基: 100 mL 水中加入0.67 g 无氨基酸酵母氮源, 2 g D 葡萄糖, 25 mmol MgCl₂, 10 mL Dropout 储液, pH 5.8;

SDG 培养基: 100 mL 水中加入 0.67 g 无氨基酸酵母氮源, 2 g D 半乳糖, 1 g 棉籽糖, 5 μmol MgCl₂, 10 mL Dropout 储液, pH 5.8;

以上培养基制备平板时每 100 mL 水额外添加 2 g 琼脂。

1.3 酵母转化

参照 Gietz 等的醋酸锂法^[10]转化, 并用 SDM 尿苷酸缺陷型平板进行筛选, 30℃ 下培养。

1.4 固体平板及液体培养基中的酵母突变体功能互补测活

挑取携有不同删除突变体质粒的酵母转化菌株, 30℃ 下在 YPDM 培养基中培养至静止期; 之后用冷 SDG 培养基洗涤 3 次并重新悬浮。测量悬浮液的吸光度 OD₆₀₀ 并用 SDG 培养基调整各转化菌株细胞浓度至 OD₆₀₀ 为 1.0; 然后取适量且等量的酵母细胞悬液涂布于 SDG 平板并在 30℃ 下培养 7 d。

在液体培养基中进行生长速度测定时, 将悬浮液 OD₆₀₀ 并调整至 0.06, 然后接种到 96 孔板中并培养 3 d, 在 630 nm 下使用 Biorad 的酶标仪检测并记录菌株生长情况。

2 结 果

2.1 酵母突变体功能互补测活体系的建立

本工作使用的酵母敲除突变体菌株为 CM 66 和 CM 52; 其中 CM 66 菌株的质膜镁离子转运基因 *Alr 1*、*Alr 2* 均被敲除, CM 52 为 CM 66 基因型对照菌株。已有报道表明, 在 CM 66 中表达鼠伤寒沙门氏杆菌 *CorA* 可以提高菌株细胞内镁离子含量, 部分缓解 CM 66 菌株的 Mg²⁺ 缺陷生长表型, 两者呈现出很好的相关性^[11]。

如图 2 所示, 含有野生型大肠杆菌 *CorA* 基因的 CM 66 菌株表现出了明显的生长; 而携有 pYES2 空质粒的 CM 66 对照转化子则由于镁离子缺乏, 生长完全被抑制。由于本互补测试试验采用的 SDG 平板仅含有 50 μmol/L Mg²⁺, 远低于胞内自由态镁离子浓度 (约 1 mmol/L), 因而大肠杆菌 *CorA* 部分互补 CM 66 镁离子缺乏生长表型, 意味着大肠杆菌 *CorA* 在酵母质膜中表达并保持了跨膜主动吸收镁离子的能力。作为基因型对照菌株的 CM 52 则均无明显生长表型改变。

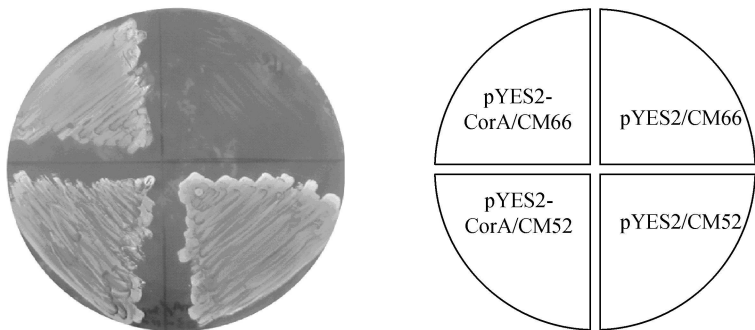


图2 酵母突变体功能互补方法测定大肠杆菌的转运活性

上述结果初步显示, 以 CM 66 菌株为平台搭建的大肠杆菌 *CorA* 镁离子转运活性测定体系, 可以作为评估 *CorA* 镁离子转运活性的间接的、简便的平台。CM 66 菌株胞内镁离子含量与其生长速度呈现出很好的线性相关关系。

2.2 CorA 蛋白的删除分析

根据拓朴结构测定和序列亲疏水性分析, 一般认为大肠杆菌 *CorA* 的间质结构域区自 N 端 M1 起始, 至 I223 或 L233 处止。本文共构建了 11 个大肠杆菌 *CorA* 的删除突变体 (如图 3 所示), 删除点的选取主要考虑以下 2 点: 1) 尽量在脯氨酸残基出现的位置,

防止打断原始结构内完整的 α 螺旋; 2) 二级结构预测结果中, 最具可能性的无规则卷曲片断中间位置。

1) 固体平板中的酵母突变体功能互补测活。

SDG 板上的互补活性测定结果如图 4 所示, 删除位于 N 端的起始 24 个残基会导致转运能力严重下降。鉴于该片段位于 N 端, 大多情况下与膜蛋白在膜上的正确定位相关, 因此该片段的删除可能影响了大肠杆菌 *CorA* 在膜上的定位; 但也不排除该片段可能参与维持了 *CorA* 发挥离子转运功能的正确构象。

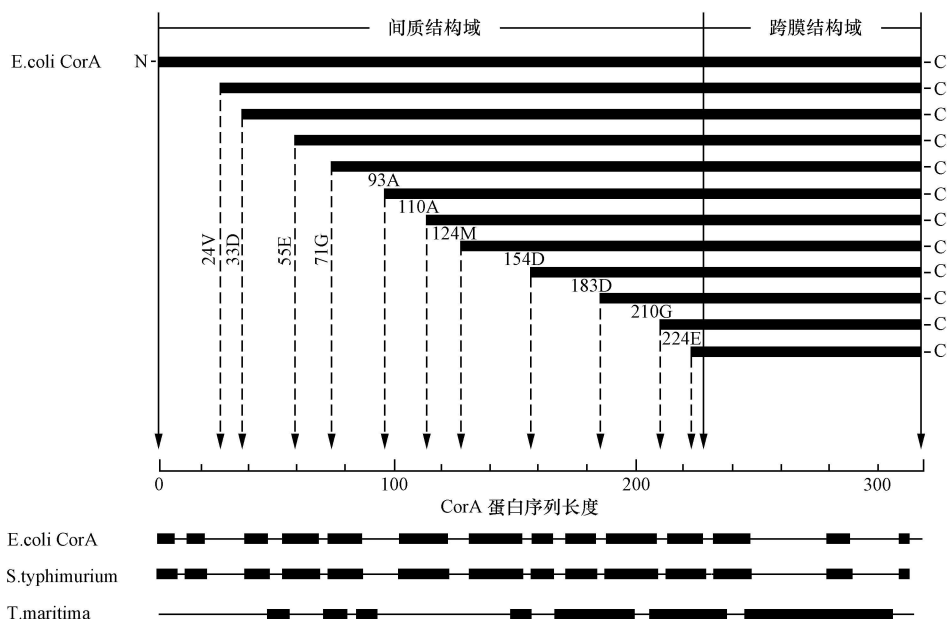


图3 大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏杆菌和海栖热孢菌 CorA 的二级结构比对及删除位点选择示意图

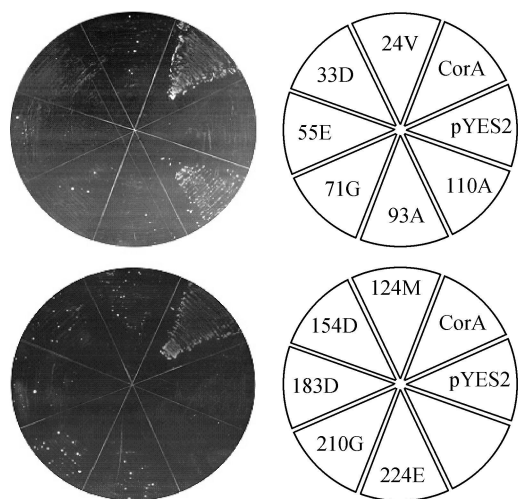


图4 固体平板中的大肠杆菌 CorA 删除突变体的互补活性测定

V 24 之后的进一步删除, CorA 互补 CM 66 镁离子缺乏生长表型的能力无显著变化。但全部删除大肠杆菌 CorA A 110 之前的片断后, CM 66 镁离子吸收能力出现显著的回升。推测 A 110 之前的片断可能形成了一个结构上相对独立的单位, 并与 A 110 之后的片断具有相互作用; 部分删除这一片断可能会导致 CorA 剩余残基干扰 A 110 之后结构单位的功能, 从而降低 CorA 的镁离子吸收能力。

A 110 之后更进一步的删除再次导致大肠杆菌 CorA 镁离子吸收能力一定程度的下降, 但其生长速度明显高于对照, 包括将几乎全部 PPD 区(M 1-E 224) 均删除的 224E CorA 突变体。

2) 液体培养基中的酵母突变体功能互补测活。

如图 5 所示, 在液体 SDG 培养基中的互补测活与平板上的测定取得的结果基本吻合。结果显示, 删除位于 N 端的起始 24 个残基会导致 CorA 转运能力下降接近 90% 之多。一般来说, 位于膜蛋白 N 端的起始残基, 大多作为信号肽帮助其正确定位到质膜上。因此该片断可能包含有信号肽段, 该片断删除影响了大肠杆菌 CorA 在膜上正确定位, 导致 CorA 转运功能的急剧下降; 但该片断也可能同样参与维持了 CorA 发挥离子转运功能所需的正确构象。

从 A 110 开始, CorA 互补 CM 66 镁离子缺乏生长表型的能力又开始明显呈现回升的趋势, 全部删除大肠杆菌 CorA M 124 之前的片断后, CM 66 镁离子吸收能力再次达到峰值。

M 124 之后更进一步的删除再次导致大肠杆菌 CorA 镁离子吸收能力的显著下降, 因而推测 M 124 到 D 154 段可能存在某些关键性残基参与了转运过程或是直接与底物结合相关。

综合来看, 所有删除突变体 CM 66 转化子的生长速度均明显高于质粒对照。这再次确证:

1) 单独的 224E 后跨膜区部分仍具有镁离子吸收能力, 这部分在结构上仍可以形成一个镁离子转运孔道; 2) 野生型 CorA 及其各个删除突变体, 均可以在酵母中表达定位到质膜上, 因为所有的转化子均表现出了一定的互补效应, 缓解了 CM 66 镁离子缺乏生长表型。

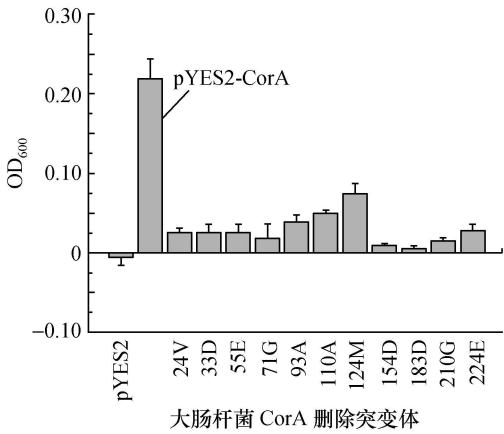


图5 液体培养基中的大肠杆菌 CorA 删除突变体的互补活性测定

3 讨论

综合液体及固体的突变体互补试验结果可以看出, 大肠杆菌 CorA N 端起始的 24 个残基, 可能包含有重要的信号肽序列负责帮助 CorA 正确定位到质膜上, 因而这一区段对于 CorA 转运活性的维持非常重要; 当然也存在另外一种解释, 即这一区段对于维持 CorA 的结构及构象有重要作用或是直接参与转运过程, 有待于进一步的针对这一区段的点突变工作来确证。V 24 到 A 110 之间的残基删除后, 明显增强而非减弱了大肠杆菌 CorA 的镁离子转运能力, 据此推测很有可能是, 删除了起始的 24 个残基后, V 24 到 A 110 段的残基会影响到 A 110 之后结构单元的结构和功能。

综合删除突变的结果, 推测起始的 110 个残基片段形成了某种独立的结构, 同余下的 192 个残基相互作用形成具有转运功能的结构。PPD 区不仅可以促进蛋白折叠, 结合底物, 并可以进行离子选择, 而余下的 CorA 结构域则负责形成孔道结构帮助 Mg^{2+} 进入胞内。

点突变的实验^[11-12]已经证明跨膜结构域的酪氨酸残基, 在转运过程中可能直接参与底物结合。这里带羟基的残基而不是负电残基起到了重要作用, 即可能是羟基而不是羧基, 同 Mg^{2+} 发生了相互作用。序列分析显示, A 110 到 D 154 段共有 3 个酪氨酸残基, 而 PPD 区一共才有 4 个酪氨酸残基。结合突变体互补测活的实验结果, 推测酪氨酸残基特别是 Y¹³⁰ 和 Y¹⁵², 可能在转运过程中起到重要作用, 这一推断有待通过进一步的点突变研究加以证明。

4 结论

本文的研究工作利用删除突变的分子生物学手

段, 对大肠杆菌 CorA 的间质结构域就行了结构与功能关系的研究, 并且成功引入了酵母突变体功能互补的方法对所得的删除突变体的活性进行了测定。通过测活实验, 准确地得到了相关的生长活性数据, 并以此为依据, 对大肠杆菌 CorA 的间质结构域在转运过程中所起到的功能作用进行了分析总结, 为进一步研究 CorA 的离子转运机理以及功能寡聚结构提供了良好的基础。

参考文献 (References)

- [1] Gardner R C. Genes for magnesium transport [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, 6(3): 263 - 267.
- [2] Moncrief M B, Maguire M E. Magnesium transport in prokaryotes [J]. *J Biol Inorg Chem*, 1999, 4(5): 523 - 527.
- [3] Hmiel S P, Snavely M D, Florer J B, et al. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: Genetic characterization and cloning of three magnesium transport loci [J]. *J Bacteriol*, 1989, 171(9): 4742 - 4751.
- [4] Smith D L, Maguire M E. Molecular aspects of Mg^{2+} transport systems [J]. *Miner Electrolyte Metab*, 1993, 19(4 - 5): 266 - 276.
- [5] Kehres D G, Lawyer C H, Maguire M E. The CorA magnesium transporter gene family [J]. *Microb Comp Genomics*, 1998, 3(3): 151 - 169.
- [6] Warren M A, Kucharski L M, Veenstra A, et al. The CorA Mg^{2+} transporter is a homotetramer [J]. *J Bacteriol*, 2004, 186(14): 4605 - 4612.
- [7] WANG Shizhen, CHEN Yong, SUN Zhanhua, et al. *Escherichia coli* CorA periplasmic domain functions as a homotetramer to bind substrate [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(37): 26813 - 26820.
- [8] Snavely M D, Florer J B, Miller C G, et al. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: $^{28}Mg^{2+}$ transport by the CorA, MgtA, and MgtB systems [J]. *J Bacteriol*, 1989, 171(9): 4761 - 4766.
- [9] Kucharski L M, Lubbe W J, Maguire M E. Cation hexaammines are selective and potent inhibitors of the CorA magnesium transport system [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(22): 16767 - 16773.
- [10] Gietz R D, Schiestl R H, Willems A R, et al. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure [J]. *Yeast*, 1995, 11(4): 355 - 360.
- [11] Smith R L, Szegedy M A, Kucharski L M, et al. The CorA Mg^{2+} transport protein of *Salmonella typhimurium*. Mutagenesis of conserved residues in the third membrane domain identifies a Mg^{2+} pore [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(44): 28663 - 28669.
- [12] Szegedy M A, Maguire M E. The CorA Mg^{2+} transport protein of *Salmonella typhimurium*. Mutagenesis of conserved residues in the second membrane domain [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(52): 36973 - 36979.