

水稻 OsGAP1 C2 结构域中对钙离子的结合能力强于对钾离子

张 凡, 张 娜, 袁 伟*, 李 瑛, 张 仟, 张英娇, 许飞云,
刘建平, 苗 锐*, 许卫锋

(福建农林大学生命科学学院作物水肥高效利用国际合作联合实验室, 福州 350002)

摘要 钙离子作为植物细胞的第二信使,广泛参与植物应对不同逆境胁迫的信号调控过程。水稻 G 蛋白促进蛋白 1(*Oryza sativa* GTPase-activating protein 1, OsGAP1) 包含 1 个 C2 结构域,而含 C2 结构域的蛋白质是一类钙离子结合蛋白质,受钙信号的调控。本研究鉴定了水稻 OsGAP1 的由 5 个保守性天冬氨酸残基组成的阳离子结合区域。该区域可结合 2 个钙离子或者钾离子,且其结合钙离子的强度高于其结合钾离子的强度,但是不能结合镁离子。当将其中 2 个保守的天冬氨酸残基(Asp-23 和 Asp-28)突变为丙氨酸后,其对钙离子的结合能力减弱。对 OsGAP1 C2 结构域阳离子结合区域结合金属离子能力的研究,有助于加深对钙信号调控蛋白质的认识,为其在农业生产中的应用提供理论依据。

关键词 C2 结构域蛋白质; 水稻 G 蛋白促进蛋白 1; 阳离子结合区域; 天冬氨酸; 点突变
中图分类号 Q50

The OsGAP1 C2 Domain of Rice Has Higher Binding Affinity for Ca^{2+} Than for K^{+}

ZHANG Fan, ZHANG Na, YUAN Wei*, LI Ying, ZHANG Qian, ZHANG Ying-Jiao,
XU Fei-Yun, LIU Jian-Ping, MIAO Rui*, XU Wei-Feng

(College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Key Laboratory of Ministry of Education
for Genetics, Breeding and Multiple Utilization of Crops, Fuzhou 350002, China)

Abstract As a second messenger, calcium is widely involved in the signal regulation in response to different environmental stresses in plants. *Oryza sativa* GTPase-activating protein 1 (OsGAP1) contains a C2 domain, and the C2 domain-containing proteins are a class of calcium-binding proteins mediated by calcium signaling. In the present study, a cation-binding site of OsGAP1 consisting of five conserved aspartic acid residues has been identified. The region can bind two calcium or potassium ions, but not magnesium ions. The strength of its binding to calcium ion is higher than that of binding to potassium ion. When two of the conserved aspartic acid residues (Asp-23 and Asp-28) were mutated to alanine, the binding strength of calcium ions was reduced. The study of the cation-binding site in the OsGAP1 C2 domain would help us to deepen the understanding of the calcium signaling proteins and provide some basic theories for its application in the agricultural ecosystem.

收稿日期: 2017-08-28; 修回日期: 2017-10-13; 接受日期: 2017-10-27

国家自然科学基金(No. 31600209, 31422047, 31761130073)和福建农林大学国际科技合作与交流资助项目(No. KXGH17005)资助

* 通讯作者 Tel: 0591-83737535, E-mail: miaorui1982@163.com; Tel: 0591-83737535, E-mail: 292547026@qq.com

Received: August 28, 2017; Revised: October 13, 2017; Accepted: October 27, 2017

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 31600209, 31422047, 31761130073) and International Scientific and Technological Cooperation and Exchange Projects in Fujian Agriculture and Forestry University(No. KXGH17005)

* Corresponding author Tel: 0591-83737535, E-mail: miaorui1982@163.com; Tel: 0591-83737535, E-mail: 292547026@qq.com

Key words C2 domain-containing protein; *Oryza sativa* GTPase-activating protein 1 (OsGAP1); cation-binding site; aspartic acid; point mutation

带有 C2 结构域(蛋白质激酶 C 保守结构域 2)的蛋白质,是除 EF-hand 蛋白质家族和膜联蛋白质家族以外,最大的钙离子结合蛋白质家族^[1]。含有 C2 结构域的蛋白质广泛存在于动物、植物、真菌和原生生物中,但在较少利用钙作为第二信使的原核生物中非常罕见^[2, 3]。C2 结构域含约 130 个氨基酸残基,采用 β -三明治折叠,由 2 条反向平行的 4- β -单链组成。目前的研究结果表明,带有 C2 结构域的蛋白质主要参与信号转导和细胞膜转运^[4, 5]。

几种带有 C2 结构域的蛋白质被报道为钙离子传感器。在人体突触囊泡的胞吐/胞吞周期模型中,钙离子作为第二信使,引发一系列的膜融合事件^[6, 7]。其他几种含 C2 结构域的蛋白质也受钙离子的调控,参与膜融合的过程,如突触结合蛋白质,一个双 C2 结构域蛋白质(DOC2),和含多个 C2 结构域的 SNARE 蛋白质^[1]。

OsGAP1 是水稻中含 1 个 C2 结构域的蛋白质,其晶体结构折叠为 C2 结构域拓扑二型,代表植物的一族典型的具有 C2 结构域的蛋白质。OsGAP1 晶体结构为一对反向平行的由 10 个 β -折叠组成的三明治结构,在 β -折叠 6 和 7 之间有 1 个 α -螺旋,两端由无规则卷曲连接。2 个阳离子结合在无规则卷曲 1 和 5 之间^[8]。

带有 C2 结构域的蛋白质具备鸟苷三磷酸酶(GTP 酶)激活蛋白质(GAPs)的功能。GAPs 属于一类 G 蛋白调节蛋白质。GAPs 与 GTP 酶作用,激发其内在的鸟苷三磷酸(GTP)水解酶活性^[9]。SynGAP 的 C2 结构域已被证明可以增强 Rap GTP 酶活性^[10]。此外,全长 PKC- α 与另一个小 G 蛋白 RhoA 的 GTP 酶活性有关。序列比对表明,OsGAP1 与 ArfGAP 所含 C2 结构域的羧基末端高度相似,但其不像 ArfGAP 的氨基末端还含 1 个锌指基序(X2-Cys-X2, 4-Cys-X12-His-X3, 4, 5-His)。因此,OsGAP1 对 GTP 酶的活性仅具有较为轻微的促进作用。

OsGAP1 能与一个新颖的非传统 G 蛋白 OsYchF1 相互作用^[11]。OsYchF1 属于 GTP 酶大家族中的 TRAFAC 总纲下 Obg 家族中的 YchF 亚家族。OsGAP1 同时促进 OsYchF1 结合与水解 GTP 和 ATP 的能力^[12, 13]。前期研究结果表明,OsGAP1 对水稻抗盐和抗病具有正调控作用,而 OsYchF1 作为负调节因子,可能在翻译水平参与水稻的抗盐和抗

病^[11, 13, 14]。OsGAP1 具备的磷脂膜结合能力与其他带有 C2 结构域的蛋白质类似。在水稻伤害处理时,OsGAP1 可招募 OsYchF1 锚定在膜上,用于执行其生物学功能^[12]。最新的研究表明,点突变 OsGAP1 阳离子结合区域,破坏 OsGAP1 结合细胞膜的能力^[8]。本研究中,运用生物化学方法,进一步分析 OsGAP1 结合不同金属离子的能力,发现除结合钙离子外,OsGAP1 也可结合钾离子,但是不能结合镁离子。部分破坏 OsGAP1 阳离子结合区域,降低了 OsGAP1 结合钙离子的能力。表明对于 OsGAP1,钙离子可能作为中间介质,参与到和细胞膜的结合。

1 材料与方法

1.1 OsGAP1 重组表达质粒的构建

OsGAP1 (BAD15699) 全长编码区 DNA 片段,从水稻(*Oryza sativa*) cDNA 文库通过 PCR 扩增获得,使用 *EcoRI* 和 *BamHI* 酶切位点插入到 pBluescript II SK (+) 载体中。然后,通过 *AgeI-Hind III* 酶切位点,将 OsGAP1 全长编码区 DNA 片段,亚克隆到表达载体 pRSETAHisSUMO 中。将构建好的表达载体,转化大肠杆菌 BL21 (DE3),选择添加 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 平板,获得单克隆菌落。单菌落接种到 50 mL 含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 培养基中,在摇床中 220 r/min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜预培养,再以 1:100 的比例加入到 3 L 含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 培养基中培养。当培养物的 A_{600} 值约为 0.6 时,加入异 β -D-半乳糖苷(IPTG)终浓度约为 1 mmol/L。再将培养物置于 220 r/min, 25 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。次日, 4 $^{\circ}\text{C}$, 9 000 g 离心 5 min, 收获大肠杆菌,立即使用,或储存在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。基于 PCR 的定点突变,构建 OsGAP1 (D23 A, D28 A) 的双突变体,突变 OsGAP1 的离子结合区域。OsGAP1 (D23 A, D28 A) 通过 PCR 获得突变 PCR 产物,它的引物分别带有 *AgeI* 和 *Hind III* 酶切位点,用于 pRSETA-SUMO 亚克隆。用 *AgeI* 和 *Hind III* 酶切 OsGAP1 (D23 A, D28 A) PCR 片段,并亚克隆到表达载体 pRSETAHisSUMO 中,在大肠杆菌中高效表达。构建好的载体经 DNA 测序验证。

1.2 OsGAP1 重组蛋白质的纯化

细胞用 35 mL 缓冲液 A 重悬浮(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 500 mmol/L NaCl, 50 mmol/L 咪唑)。

超声处理后的细胞裂解液于 4℃, 18 000 g 离心 50 min, 沉淀细胞碎片。上清加入到由缓冲液 A 平衡的镍树脂柱。靶蛋白质结合在树脂上, 而其他大肠杆菌的杂蛋白质被除去。用 10 倍柱体积的缓冲液 A 清洗镍树脂柱, 缓冲液 B (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 500 mmol/L NaCl, 300 mmol/L 咪唑) 用于洗脱 HisSUMO⁰sGAP1。收集缓冲液 B 洗脱液。在 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 100 mmol/L NaCl 的缓冲液中进行透析, 除去咪唑。同时, 应用 SUMO 蛋白酶, 切割 HisSUMO 与靶蛋白质。含 OsGAP1、HisSUMO 和 SUMO 蛋白酶的透析液再次加入到镍树脂柱。过柱后收集 OsGAP1。为了最大限度地提高目标蛋白质的产量, 用 10 倍柱体积缓冲液 A 冲洗柱子。再用 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 100 mmol/L NaCl, 2 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA 透析 OsGAP1 蛋白。为了进一步实现纯化和去除 EDTA 与金属离子, 使用交联葡聚糖凝胶过滤柱, 纯化 OsGAP1 蛋白, 用 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.3, 100 mmol/L NaCl 平衡和洗脱 OsGAP1 蛋白。

1.3 荧光发射光谱测量

1 μmol/L 纯化的 OsGAP1 (野生型) 和 OsGAP1 (D23 A, D28 A) 突变体蛋白质溶解在缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 100 mmol/L NaCl 和 1 mmol/L DTT) 中, 分别添加 0.1 mmol/L EGTA、

1 mmol/L MgCl₂、1 mmol/l KCl 和 1 mmol/L CaCl₂ 后, 在 280 nm 处激发, 发射光谱在 300 ~ 350 nm 处通过荧光分光光度计收集。

1.4 电感耦合等离子体发射光谱法对 OsGAP1 与钙、镁结合的测定

将 1 mmol/L Ca (NO₃)₂ 或 1 mmol/L EDTA 分别加入到纯化的 OsGAP1 蛋白溶液中 (缓冲液: 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT)。过量的、游离的 EDTA 和 Ca (NO₃)₂ 的复合物通过脱盐柱去除。最后, 3 个样品 OsGAP1、OsGAP1 (EDTA) 和 OsGAP1 (Ca (NO₃)₂) 采用电感耦合等离子体发射光谱仪 (ICP-OES) 测定钙离子含量。计算钙离子和 OsGAP1 蛋白的摩尔比例, 获得 OsGAP1 结合钙离子的数目。

1.5 统计学方法

采用 Microsoft Excel 2007 对所测数据进行统计和分析, 组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 OsGAP1 属于拓扑 II 型 C2 结构域蛋白质

OsGAP1 晶体结构已经被解开 (PDB: 4RJ9), 其折叠属于 C2 结构域拓扑 II 型, 并且在植物中表现为典型的 C2 结构域蛋白质 (Fig. 1)^[12, 15]。通过运用

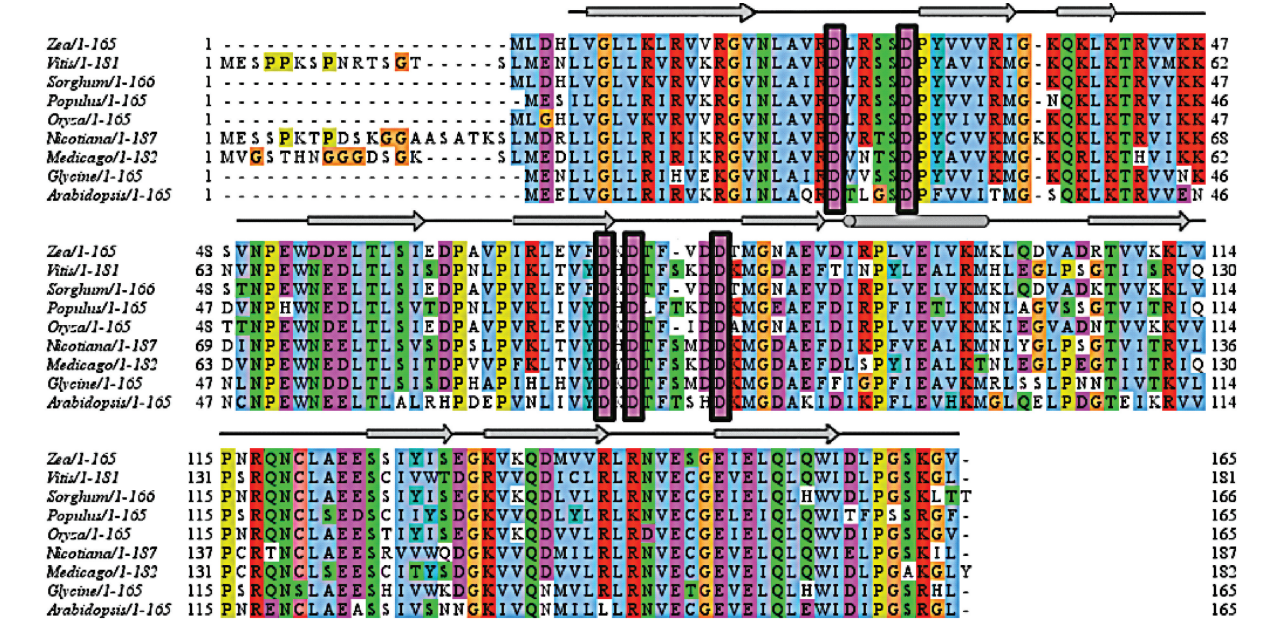


Fig.1 The alignment of amino acid sequence of OsGAP1 and its homologs in plants and the schematic representative topology Amino acid sequence alignments of OsGAP1 and its homologs in plants using Jalview software (<http://www.jalview.org/download>). Different colors mean various kinds of amino acids. Blue represents amino acids with hydrophobic side chains; purple represents amino acids with negative charged side chains; brown represents glycine; red represents amino acids with positive charged side chains; green represents amino acids with polar uncharged side chains; yellow and pink represents special amino acids. Five conserved aspartic acid residues were circled

Jalview 软件(<http://www.jalview.org/download>),将 OsGAP1 氨基酸序列与其他植物同源基因的氨基酸序列进行比对。发现氨基酸序列保守性超过 90%,并且 5 个保守的天冬氨酸存在于 OsGAP1 及其他植物同源基因的 C2 结构域中,主要参与结合金属离子 (Fig. 2A)。运用三维结构成相软件 Pymol (www.pymol.org),绘制出 OsGAP1 的三维结构图 (Fig. 2A)。OsGAP1 含有 165 个氨基酸残基,其中 C2 结构域的核心模块占 135 个氨基酸残基,另外 30 个氨基酸残基形成 2 股 β -链和 1 个 α -螺旋 (Fig. 1)。整体结构呈现为一对反向平行由 10 个 β -链构成 β -折叠, β -链 6 和 7 间为 1 个 α -螺旋 (Fig. 2A)。

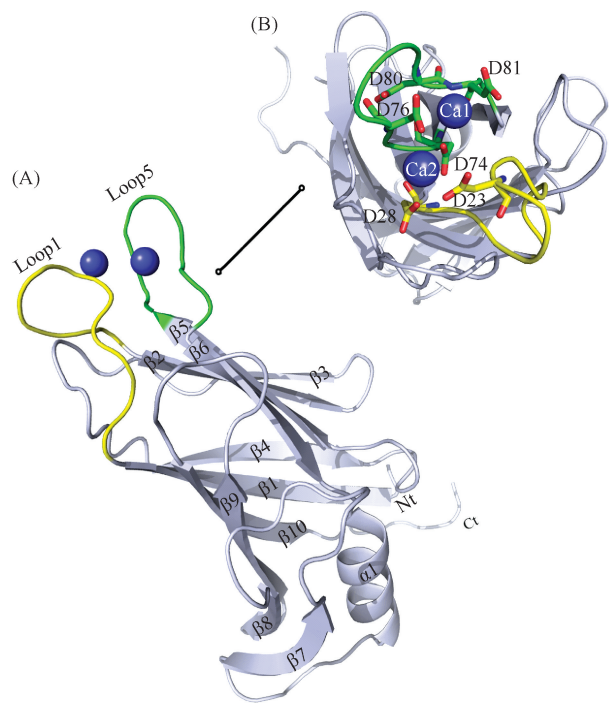


Fig. 2 3-D structural overview of OsGAP1 and its ions-binding sites (A) Cartoon representation of OsGAP1 structure with positions of two binding loops between loop 1 and loop 5 for potential metal cations drawn using Pymol software (www.pymol.org). The crystal structure files (4rj9.pdb and 4rj9.gz) of OsGAP1 were downloaded from PDB (Protein Data Bank) website (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), and the PDB ID is 4RJ9. (B) OsGAP1 cation binding region with six conserved aspartic acid residues shown as sticks and potential metal cations shown as blue spheres

2.2 OsGAP1 阳离子结合区域的 2 个保守性天冬氨酸残基参与结合 2 个金属阳离子

将 OsGAP1 (PDB ID: 4RJ9) 的晶体结构文件 (4rj9.pdb 和 4rj9.gz) 从 PDB (Protein Data Bank) 网站 (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) 下

载。通过运用晶体结构分析软件 Coot (<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/Personal/pemsley/cool/>),观察到在电子密度 1σ 下 (消除背景氨基酸分子的电子密度云),2 个离子半径较大的金属离子 (蓝色网格区域),显示在 $2F_o(F_o - F_c)$ 电子密度图中 (Fig. 3A),分别命名为 Cation-1 (Ca-1) 和 Cation-2 (Ca-2) (Fig. 3A)。在 $F_o - F_c$ 电子密度图中,2 个假定的位点显示为金属离子属性 (红色网格区域) (Fig. 3B)。如 Fig. 2B 所示,6 个带负电荷的天冬氨酸残基围绕形成一个口袋状的离子结合区域,但其中只有 5 个天冬氨酸残基参与 2 个阳离子的结合 (Fig. 2B)。位于环 1 的 2 个保守性天冬氨酸 (Asp-23、Asp-28) 和位于环 5 的 3 个保守性天冬氨酸 (Asp-74、Asp-76 和 Asp-81) 构成 1 个口袋状的阳离子结合区域。Asp-80 在离子结合区以外并且远离 2 个金属离子,不参与金属离子的结合 (Fig. 2B)。

进一步运用 Pymol 软件分析,发现 2 个金属离子在阳离子结合区域均为 6 配位。Asp-23、Asp-28、Asp-74 的 O1/O2 和 Lys-75 的骨架的羧基团连接 Ca-1,距离分别为 2.54 Å、2.34 Å、2.48 Å 和 2.42 Å; Asp-81 的 O82 和 Arg-22 的骨架羧基团参与 Ca-2 的结合,距离分别为 2.58 Å 和 2.47 Å。Asp-76 不能直接与金属离子形成离子键,距离大于 4 Å (Fig. 4B)。水分子在 2 个离子结合位点发挥关键的作用,W-35 加入 Ca-1 的绑定,而 W-5、W-26 和 W-121 辅助 Ca-2 的结合 (Fig. 4A、B)。

2.3 OsGAP1 晶体结构阳离子结合区域存在 2 个钾离子

为了确定在 OsGAP1 晶体结构的离子结合区域是什么金属离子,利用电感耦合等离子体发射光谱法 (ICP-OES),测定重组纯化的 OsGAP1 蛋白中钙、镁和钾的浓度。结果表明,纯化的 OsGAP1 蛋白含有钙,且 OsGAP1 蛋白与钙的摩尔比为 0.101。加入 1 mmol/L $CaCl_2$ 处理后,OsGAP1 蛋白与钙的摩尔比为 1.389,提示在钙饱和条件下 OsGAP1 可以结合 2 个钙离子。用 1 mmol/L EDTA 处理移除 OsGAP1 蛋白中所有的金属离子,ICP - OES 的 CPS 为负 (Table 1)。

从 $2F_o - F_c$ 与 $F_o - F_c$ 图中观察到的金属离子的电子密度不应该是钙,因为 ICP-OES 结果显示,纯化的 OsGAP1 蛋白中,所含的钙离子 (Ca/OsGAP1 摩尔比为 0.1) 浓度太低,图中金属离子的电子密度疑为其他阳离子所致。从分析结晶的沉淀剂组分可知,沉淀剂中含有 0.2 mol/L 酒石酸钾钠水合物, $2F_o - F_c$ 与

Fo-Fc 电子密度图中观察到的金属离子应该是钾。钾离子和钙离子的大小相似,这也解释了为什么从 2Fo-

Fc 电子密度图中看到电子密度表现出钙的性质,直径大于碳、氮、氢和氧原子(Fig. 2A)。

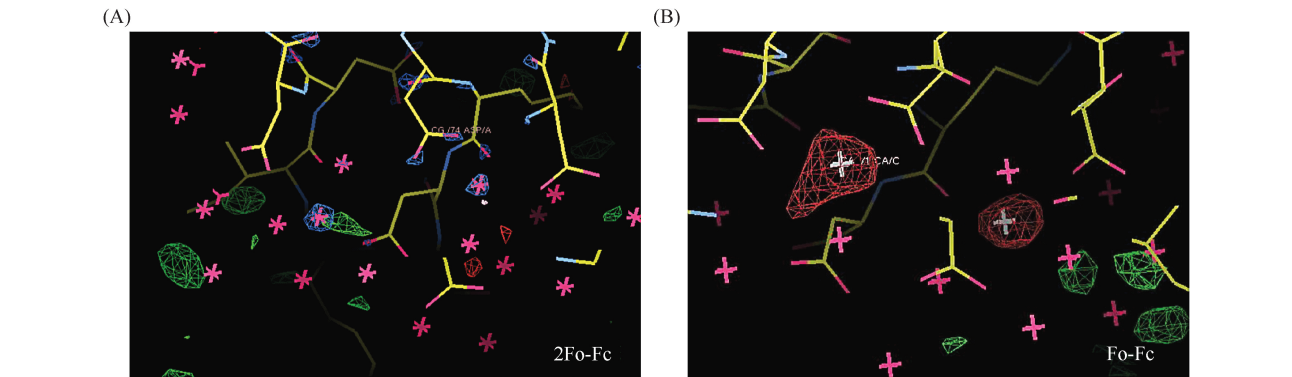


Fig.3 2Fo-Fc and Fo-Fc electron density map showing the electron density of two metal cations at ion-binding sites of OsGAP1 (A) Fo-Fc electron density map contoured at 1 σ showing two larger figures at ion binding sites of OsGAP1 using Coot software (<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/Personal/pemsley/cool/>). Blue color represents electron density. (B) Fo-Fc map contoured at 1 σ showing the electron density of two metal cations at ion-binding sites of OsGAP1 (red color represents positive charge)

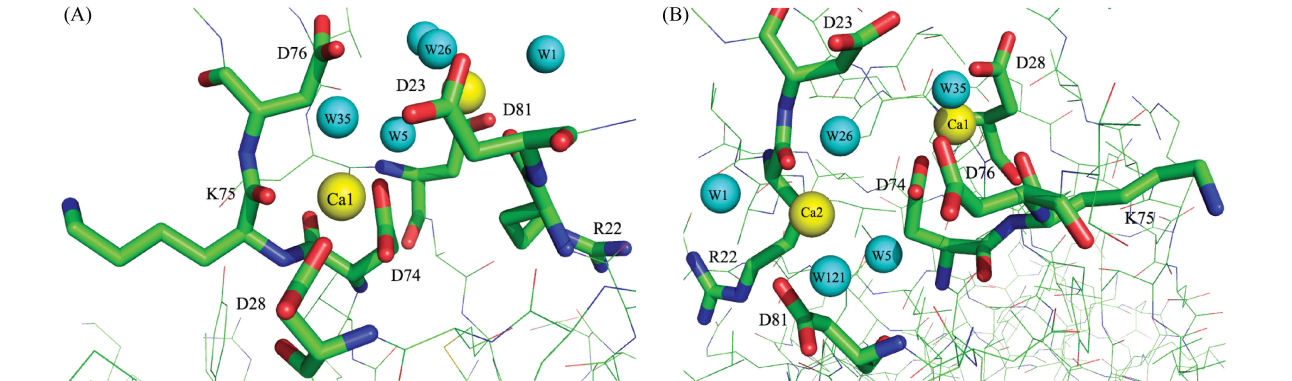


Fig.4 Stick and sphere representation of pocket-like ion-binding sites (A) Potential metal cations (Ca-1) form six coordination bonds by aspartic acid residues and water (W-35) drawn using Pymol software (www.pymol.org). (B) Potential metal cations (Ca-2) form six coordination bonds by aspartic acid residues and water (W-5, W-26 and W-121). Yellow spheres represent cations, and blue spheres represent water

Table 1 OsGAP1 ICP results on calcium and the molar ratio of OsGAP1 protein and calcium ionin the absence or presence of 1 mmol/L CaCl₂ or 1 mmol/L EDTA

	No treatment	1 mmol/L CaCl ₂	1 mmol/L EDTA
Calcium concentration (CPS)	26579. 6954	1023402. 063	-99. 25610109
Calcium concentration (μmol/L)	1. 31104175	20. 48902063	#
OsGAP1 protein concentration (μmol/L)	13. 0184	14. 75	14. 0012
Calcium/OsGAP1 protein ratio	0. 100706826	1. 389086144	#

CPS is ICP values, # means no calcium existence

2.4 OsGAP1 阳离子结合区域优先结合钙

为了进一步确定 OsGAP1 结合钙、钾和镁的能力,本文分别加入 1 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂ 和 1 mmol/L KCl 后,分别测量 OsGAP1 C2 结构域内芳香族氨基酸的荧光光谱。

本室前期的研究表明,C2 结构域中存在或不存

在金属离子能引起其周围芳香族氨基酸的荧光变化,变化的荧光可被检测^[16, 17]。此外,用丙氨酸取代 Asp-23 和 Asp-28 产生的双突变体,打破了天冬氨酸和金属离子之间形成的盐桥。通过荧光强弱变化,检测点突变导致的结合金属离子能力的变化。

分别在 0.1 mmol/L EGTA、1 mmol/L MgCl₂、

1 mmol/L KNO_3 和 1 mmol/L CaCl_2 的处理后,观测野生型 OsGAP1 和 D-A 突变型 OsGAP1 蛋白荧光强弱。用 1 mmol/L CaCl_2 和 1 mmol/L KNO_3 处理野生型 OsGAP1 的 F. I. 值 (Fluorescence intensity) 高于用 1 mmol/L MgCl_2 和 0.1 mmol/L EGTA 处理的结果,且 1 mmol/L MgCl_2 和 0.1 mmol/L EGTA 处理的 F. I. 值大小相同,表明 OsGAP1 可以结合钙和钾,但不能结合镁。1 mmol/L MgCl_2 未检测到 F. I. 值的增加,说明镁离子不能结合 OsGAP1 (Fig. 5)。用 1 mmol/L 的 CaCl_2 处理 OsGAP1 的 F. I. 值高于 1 mmol/L KNO_3 的处理结果,表明相对钾来说,OsGAP1 更容易结合钙 (Fig. 5)。此外,0.1 mmol/L EGTA 处理 OsGAP1 的 F. I. 值与未处理的 OsGAP1 类似,表明未经处理的 OsGAP1 不含大量的金属离子。

用 1 mmol/L CaCl_2 处理样品, D-A 突变型 OsGAP1 的 F. I. 值小于野生型 OsGAP1。表明 D-A 突变影响了钙结合区域,使得 D-A 突变型 OsGAP1 对钙的结合强度低于野生型 OsGAP1。然而,双天冬氨酸突变不足以完全消除 OsGAP1 结合钙离子的

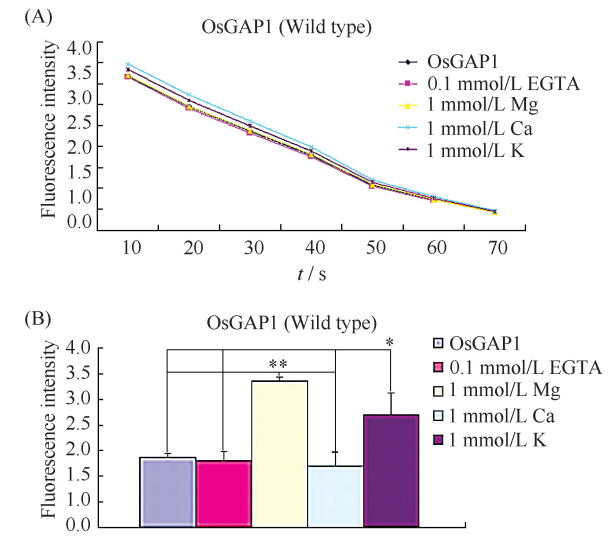


Fig. 5 Fluorescence intensity of OsGAP1 (wild-type) after adding 0.1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L KCl and 1 mmol/L CaCl_2 using a spectrofluorometer (A) Fluorescence intensity of 1 $\mu\text{mol/L}$ purified OsGAP1 (wild-type) after adding 0.1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L KCl or 1 mmol/L CaCl_2 respectively, which were excited at 280 nm and the emission spectra was collected from 290 to 380 nm by a spectrofluorometer. (B) Maximum fluorescence intensity of OsGAP1 (wild-type) after adding 0.1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L KCl or 1 mmol/L CaCl_2 respectively (error bars represent the SE, $n = 4$); * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$ by Student's t -test represents the SE ($n = 4$)

能力,所以 D-A 突变型 OsGAP1 仍保留一定程度的钙离子结合能力 (Fig. 6)。D-A 突变型 OsGAP1 和野生型 OsGAP1 在 MgCl_2 处理下的荧光值与 0.1 mmol/L EGTA 处理下的荧光值相同,表明 OsGAP1 不能结合镁离子。

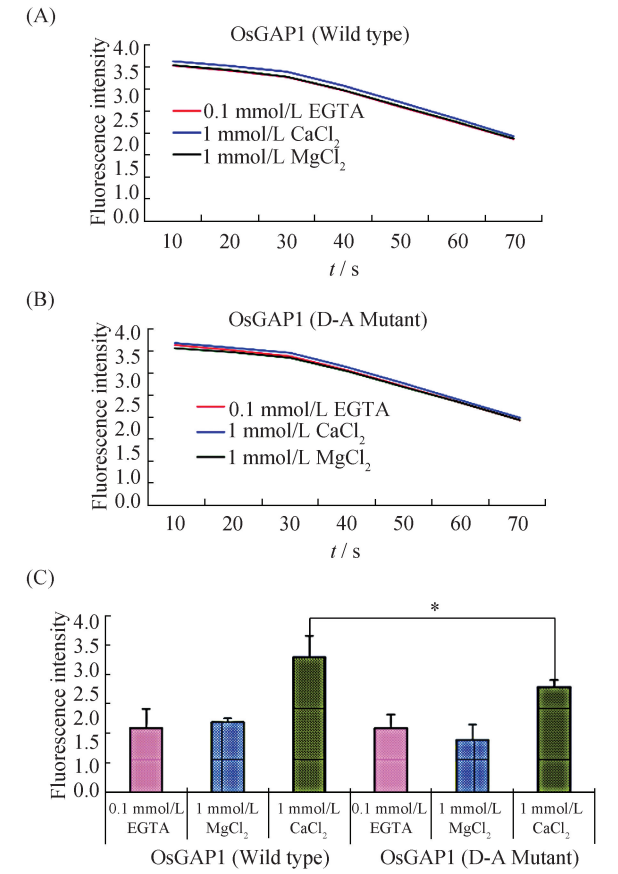


Fig. 6 Fluorescence intensity (F. I.) of OsGAP1 after adding EGTA, MgCl_2 , KCl or CaCl_2 respectively (A) Fluorescence intensity of 1 $\mu\text{mol/L}$ purified OsGAP1 (wild type) proteins with 1 mmol/L CaCl_2 , 0.1 mmol/L EGTA, or 1 mmol/L MgCl_2 respectively excited at 280 nm and the emission spectra was collected from 290 to 380 nm by a spectrofluorometer. (B) Fluorescence intensity of 1 $\mu\text{mol/L}$ OsGAP1 (D-A mutant) after adding 0.1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L MgCl_2 or 1 mmol/L CaCl_2 respectively using a spectrofluorometer. (C) Maximum fluorescence intensity comparison of OsGAP1 (wild-type) and OsGAP1 (D-A mutant) after adding 0.1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L MgCl_2 or 1 mmol/L CaCl_2 respectively (error bars represent the SE, $n = 4$); * $P < 0.05$ by Student's t -test represents the SE ($n = 4$) of OsGAP1 or OsGAP1 (D-A Mutant) in the presence of 1 mmol/L Ca

3 讨论

在本文中分析了 OsGAP1 的晶体结构,研究主要集中在 OsGAP1 的 C2 结构域的阳离子结合区域。

该区域由 5 个保守的天冬氨酸构成。用丙氨酸替换 2 个天冬氨酸 (Asp-23 和 Asp-28), 从而破坏金属离子和天冬氨酸羧基基团之间的相互作用。未将 2 个保守的天冬氨酸全部突变, 是考虑到可能会破坏 OsGAP1 的三维结构, 使其不稳定, 失去研究阳离子结合区域的意义。荧光光谱结果发现, OsGAP1 阳离子结合区域可以结合钙和钾离子, 但是不能结合镁离子, 并且结合钙离子的能力强于结合钾离子。

此外, 运用三维结构分析软件 Pymol, 将 OsGAP1 的晶体结构与另外 2 个人体中的 C2 结构域蛋白质的晶体结构 (亲和蛋白质 3A C2A/C2B) 做比较^[18, 2]。OsGAP1 同亲和蛋白质 3A C2A 和 C2B 的结构高度相似, 尤其是在离子结合区域。1 个金属离子结合环在 OsGAP1 和亲和蛋白质 3A 的 C2A/C2B 保守, 但另一个环, 在亲和蛋白质 3A C2A 中不保守 (Fig. 7B)^[19, 20]。可能是因为亲和蛋白质 3A C2A 的 1 个半胱氨酸被 1 个谷氨酸取代 (Fig. 7A)。

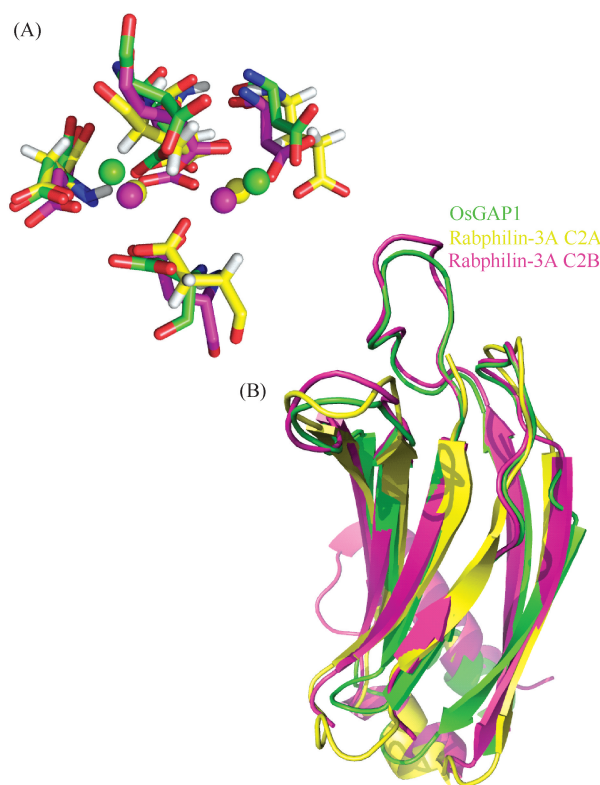


Fig. 7 Structural alignments of OsGAP1, C2A domain of Rabphilin 3A and C2B domain of Rabphilin 3A (OsGAP1, green; the C2A domain of Rabphilin 3A, pink; the C2B domain of Rabphilin 3A, yellow)

(A) The possible positions of metal cations at pocket-like ion-binding sites of OsGAP1, C2A domain of Rabphilin 3A and C2B domain of Rabphilin 3A. (B) Structural alignments of OsGAP1, C2A domain of Rabphilin 3A and C2B domain of Rabphilin 3A

钾离子是植物所需的元素, 在植物体内广泛存在, 参与 OsGAP1 的生物学功能; 而钙离子是中量元素, 具备第二信使的作用, 在 OsGAP1 参与植物抵抗生物和非生物胁迫的信号传递过程中扮演重要的角色。C2 结构域模块由于其钙离子结合性被认为钙离子传感器。我们以往的研究证明, OsGAP1 作为植物防御反应途径的正调控因子, 可以增强水稻对白叶枯病菌的抗性。在拟南芥的 OsGAP1 过量表达株系, OsGAP1 以 NPR1 依赖的方式, 过量表达 PR1 基因来抵御病原菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000 的侵染^[11]。对 OsGAP1 钙离子结合区域的研究, 为进一步在生理水平上研究 OsGAP1 参与钙信号的机制, 提供结构生物学方面的理论依据。

参考文献 (References)

- [1] Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: linking Ca^{2+} signaling to membrane dynamics [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, **6**(6): 449-461
- [2] Verdaguer N, Corbalan-Garcia S, Ochoa WF, *et al.* Ca^{2+} bridges the C2 membrane-binding domain of protein kinase Calpha directly to phosphatidylserine [J]. *EMBO J*, 1999, **18** (22): 6329-6338
- [3] Coudevylle N, Montaville P, Leonov A, *et al.* Structural determinants for Ca^{2+} and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding by the C2A domain of rabphilin-3A [J]. *J Biol Chem*, 2008, **283** (51): 35918-35928
- [4] Jeworutzki E, Roelfsema MRG, Anschütz U, *et al.* Early signaling through the Arabidopsis pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca^{2+} -associated opening of plasma membrane anion channels [J]. *Plant J*, 2010, **62**(3): 367-378
- [5] Nalefski EA, Falke JJ. The C2 domain calcium-binding motif: Structural and functional diversity [J]. *Protein Sci*, 1996, **5** (12): 2375-2390
- [6] Boudsocq M, Willmann MR, McCormack M, *et al.* Differential innate immune signaling via Ca^{2+} sensor protein kinases [J]. *Nature*, 2010, **464**(7287): 418-422
- [7] 朱运峰. 钙离子结合蛋白及其在神经系统疾病中的作用 [J]. *中国生物化学与分子生物学报* (Zhu YF. Roles of calcium binding protein in neural system diseases [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2008, **24**(5): 413-418
- [8] Yung YL, Cheung MY, Miao R, *et al.* Site-directed mutagenesis shows the significance of interactions with phospholipids and the G-protein OsYchF1 for the physiological functions of the rice GTPase-activating protein 1 (OsGAP1) [J]. *J Biol Chem*, 2015, **290**(39): 23984-23996
- [9] Barr F, Lambrigh DG. Rab GEFs and GAPs [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, **22**(4): 461-470
- [10] Pena V, Hothorn M, Eberth A, *et al.* The C2 domain of SynGAP is essential for stimulation of the Rap GTPase reaction [J]. *EMBO Rep*, 2008, **9**(4): 350-355
- [11] Cheung MY, Zeng NY, Tong SW, *et al.* Constitutive expression of a rice GTPase-activating protein induces defense responses [J]. *New Phytol*, 2008, **179**(2): 530-545
- [12] Cheung MY, Xue Y, Zhou L, *et al.* An ancient P-Loop GTPase in rice is regulated by a higher plant-specific regulatory protein [J]. *J Biol Chem*, 2010, **285**(48): 37359-37369
- [13] Cheung MY, Li X, Miao R, *et al.* ATP binding by the P-loop NTPase OsYchF1 (an unconventional G protein) contributes to biotic but not abiotic stress responses [J]. *Proc Natl Acad Sci U*

- S A, 2016, **113**(10): 2648-2653
- [14] Cheung MY, Li MW, Yung YL, *et al.* The unconventional P-loop NTPase OsYchF1 and its regulator OsGAP1 play opposite roles in salinity stress tolerance [J]. *Plant Cell Environ*, 2013, **36** (11): 2008-2020
- [15] Rizo J, Sudhof TC. C2-domains, Structure and Function of a universal Ca^{2+} -binding domain[J]. *J Biol Chem*, 1998, **273** (26): 15879-15882
- [16] Johnson CP, Chapman ER. Otoferlin is a calcium sensor that directly regulates SNARE-mediated membrane fusion[J]. *J Cell Biol*, 2010, **191**(11): 187-197
- [17] Nalefski EA, Wisner MA, Chen JZ, *et al.* C2 domains from different Ca^{2+} signaling pathways display functional and mechanistic diversity[J]. *Biochemistry*, 2001, **40**(10): 3089-3100
- [18] Montaville P, Schlicker C, Leonov A, *et al.* The C2A-C2B linker defines the high affinity Ca^{2+} binding mode of rabphilin-3A[J]. *J Biol Chem*, 2007, **282**(7): 5015-5025
- [19] Martens S, Kozlov MM, McMahon HT. How synaptotagmin promotes membrane fusion[J]. *Science*, 2007, **316** (5828): 1205-1208
- [20] Liu Z, Lin L, Yuan C, *et al.* Trp2313-His2315 of Factor VIII C2 domain is involved in membrane binding: structure of a complex between the C2 domain and an inhibitor of membrane binding [J]. *J Biol Chem*, 2010, **285**(12): 8824-8829