

定点突变法对人白细胞介素-2C 末端 α 螺旋的结构和功能研究

徐 荻 蒋春雷* 石 颖 虞建良
孙兰英 范佩芳 刘新垣

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

用寡核苷酸诱导的基因定位突变法, 将人白细胞介素-2C 末端两亲性 α 螺旋中 125 位和 127 位残基分别或同时突变为 Pro, 并测定其生物活性和空间结构。结果发现所得突变体的生物学活性均急剧下降, 同时 α 螺旋含量以及 C 端螺旋中残基的空间位置也发生了不同程度的变化。结果提示, C 端 α 螺旋尤其是其疏水面的完整性对维持白介素-2 的生物活性有重要作用。

关键词 白细胞介素-2; 基因定位突变; 结构-功能关系

白细胞介素-2(IL-2)是机体复杂免疫网络中起调节作用的最重要的淋巴因子, 但 IL-2 的异常增高也会给机体带来不良影响。因此定向改造 IL-2 的分子结构使其成为具有高活性、低毒性的超级 IL-2 或能阻断 IL-2 活性的拮抗剂, 将有十分广泛的应用前景。研究 IL-2 的结构-功能关系, 尤其是 IL-2 与其受体(IL-2R)中不同亚基的亲合关系, 是研制新型 IL-2 的基础。IL-2 是一个典型的 α 螺旋蛋白, 其分子中包含 A—D 四段 α 螺旋^[1]。以往研究发现 C 末端 D 螺旋中某些残基如¹²⁵Cys、¹²⁶Gln 等的取代均不影响 IL-2 的生物活性, 但分别缺失这些残基却导致生物活性急剧下降, 因而推测 D 螺旋的空间结构的完整与稳定是维持 IL-2 活性的重要因素^[2,3]。为了进一步确定 D 螺旋空间结构在 IL-2 活性中的重要性, 我们将 D 螺旋中¹²⁵Cys 和¹²⁷Ser 分别或同时突变为 Pro, 并测定突变体的结构和活性变化, 结果证明 D 螺旋的二级结构完整性对 IL-2 的生物活性十分重要。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 菌种和质粒: 重组人 IL-2 基因及表达质粒 pLY-4 γ 由本室研制^[4]。E.coli CJ236 (dut⁻ ung⁻)、E.coli JM105、E.coli JF1125 均由本室提供。

2. 试剂: 限制酶及其它工具酶购自 Boehringer Mannheim 公司; 双脱氧末端终止法测序试剂购自 New England Biolabs 公司; 其余试剂均为国产或进口分析纯试剂。

3. 仪器: JASCO J-500C 型圆二色仪, 日立 MPF-4 型荧光分光光度计。

(二) 方法

1. 基因定位突变和表达: 基因定位突变参照 Maniatis 等的方法^[5], 将含重组人 IL-2 基因的 M13mp18 转染 E.coli CJ236, 提取单链 U-DNA, 将人工合成的

本文于 1992 年 10 月 4 日收到。

*现在第二军医大学神经生物学教研室。

诱变引物与U-DNA体外杂交，合成出互补链后，转化野生菌 *E. coli* JM105，挑白色噬菌斑提取单链，双脱氧末端终止法测 DNA 序列，筛选出突变基因。将突变基因用EcoRI、Sal I切下，与质粒 pLy-4γ的载体连接，获得突变质粒。

转入突变质粒的 *E. coli* JF1125在M₉培养液中30℃培养至A₆₀₀为0.3—0.5，转42℃继续培养3h，5000g离心10min收集菌体^[4]。IL-2及其突变体的纯化按本室已建立的方法进行（范佩芳等，待发表资料）。

2. IL-2生物活性测定：用IL-2依赖的CTLL-2细胞，参照文献[6]的方法，根据³H-TaR的参入量来确定IL-2的含量。

3. 圆二色性测定：IL-2样品溶解在

10mmol/L PB(pH8.0)中，测定远紫外圆二色性光谱，采用0.1cm光径的鼓形比色池，在室温18℃下进行测定。缓冲液的干扰通过计算机消除。

4. 荧光分析：激发光谱及发射光谱狭缝宽度均为3.5nm，采用1cm方形荧光比色杯于室温18℃进行测定。为避免内吸收效应，控制样品蛋白密度于280nm处的光吸收小于0.05。

结 果

(一) 突变体的制备

人工合成的诱变引物(见表1)与含天然IL-2基因的U-DNA单链模板体外杂交，合成出杂交的双链DNA，转化JM105后，经DNA序列测定，筛选出¹²⁵Pro

表 1 用于重组IL-2突变的人工合成寡核苷酸
Table 1 Synthetic oligonucleotides used for rIL-2 mutagenesis

Mutation	Oligonucleotides
¹²⁵ Cys→Pro	GATGCTTTGAGGAAAGGTAATC
¹²⁷ Ser→Pro	TGAGATGATAGGTTGACAAAAG
¹²⁵ Pro and ¹²⁷ Ser→Pro	TGAGATGATGGGTTGAGGAAAGGTAATC

The underlined codons indicate the amino acid substitutions

-IL-2、¹²⁷Pro-IL-2和¹²⁵Pro-¹²⁷Pro-IL-2三种突变基因。将突变基因装在表达载体中，并在*E. coli* JF1125中获得表达(图1)。

(二) 突变体的生物学活性

将纯化的IL-2及其突变体同时测定生物学活性，并计算比活性。结果发现突变体的活性均有下降，见表2。

(三) 突变体的空间结构

对天然IL-2及其突变体的圆二色性检测结果见图2。天然IL-2的远紫外圆二色性光谱表现为一典型的α螺旋蛋白光谱。3个突变体的α螺旋含量均显著下降，尤以¹²⁵Pro-¹²⁷Pro-IL-2下降更为显著。根据208nm处的椭圆值计算α螺旋含量，天

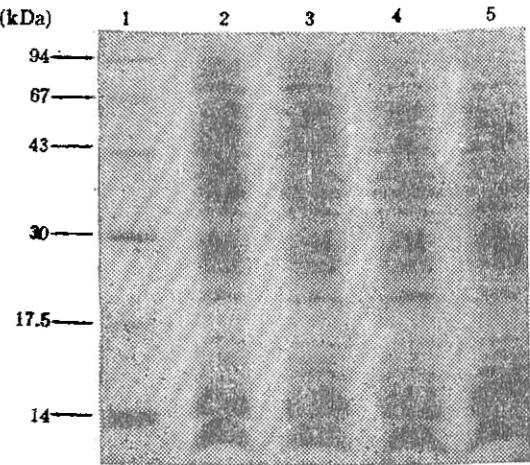


图 1 重组IL-2及其突变体SDS-PAGE电泳分析
Fig. 1 SDS-PAGE of bacterial expressing rIL-2 and the analogs

1. Standard MW marker, 2. rIL-2, 3. ¹²⁵Pro-IL-2, 4. ¹²⁷Pro-IL-2, 5. ¹²⁵Pro-¹²⁷Pro-IL-2

表 2 重组IL-2及其突变体的生物学活性
Table 2 Bioactivity of rIL-2 analogs

Mutation	Bioactivity(\pm SD) (%)
rIL-2	100
125 Cys \rightarrow Pro	7.0 (1.9)
127 Ser \rightarrow Pro	4.5 (2.2)
125 Cys and 127 Ser \rightarrow Pro	1.2 (0.2)

Bioactivity was calculated as percent activity as compared with the wild type rIL-2, measured on murine CTL-2 cells. The data were mean value of five experiments

然IL-2为64.1%， 125 Pro-IL-2与 127 Pro-IL-2为61.8%， 125 Pro- 127 Pro-IL-2为51.6%。

天然IL-2及其突变体的内源荧光光谱见图3。天然IL-2的内源性荧光光谱主峰在322.5nm， 127 Pro-IL-2主峰在326nm， 125 Pro-IL-2在331.5nm， 125 Pro- 127 Pro-IL-2的主峰在332.5nm。由于IL-2分子中仅含 121 Trp一个Trp，内源性荧光光谱

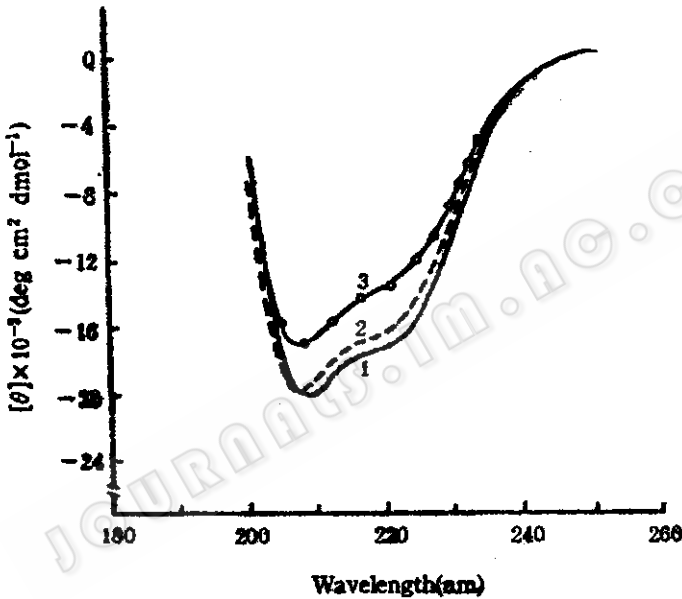


图 2 重组IL-2及其突变体的圆二色性光谱

Fig. 2 CD spectra of rIL-2 and its analogs

1. Wild type rIL-2; 2. 125 Pro-IL-2 and 127 Pro-IL-2; 3. 125 Pro- 127 Pro-IL-2

的红移说明 121 Trp微环境的疏水性降低⁴。

讨 论

IL-2分子C末端113—133位残基形成两亲性 α 螺旋-D螺旋。Landgraf等曾用化学方法人工合成了该段螺旋，并将之与IL-2分子的N端(1—112位残基)通过 58 Cys和 105 Cys相连，制备了半合成IL-2，发现改变C末端 α 螺旋的稳定性对半合成IL-2的生物活性有调节作用^[7]。但

这种半合成IL-2在二级结构上和活性上均与天然IL-2相差很大(活性比天然IL-2低2000倍)，在此基础上进行的结构功能研究不易准确反映天然IL-2的结构功能关系。我们用基因定位突变法将天然IL-2分子C末端 125 Cys和 127 Ser分别或同时突变为Pro，以不同程度地破坏其二级结构，结果表明，D螺旋的二级结构确与IL-2的生物活性有关，破坏D螺旋，生物活性显著下降，螺旋破坏越严重，活性下降越显著。但 125 Pro与 127 Pro突变尽管对 α 螺旋

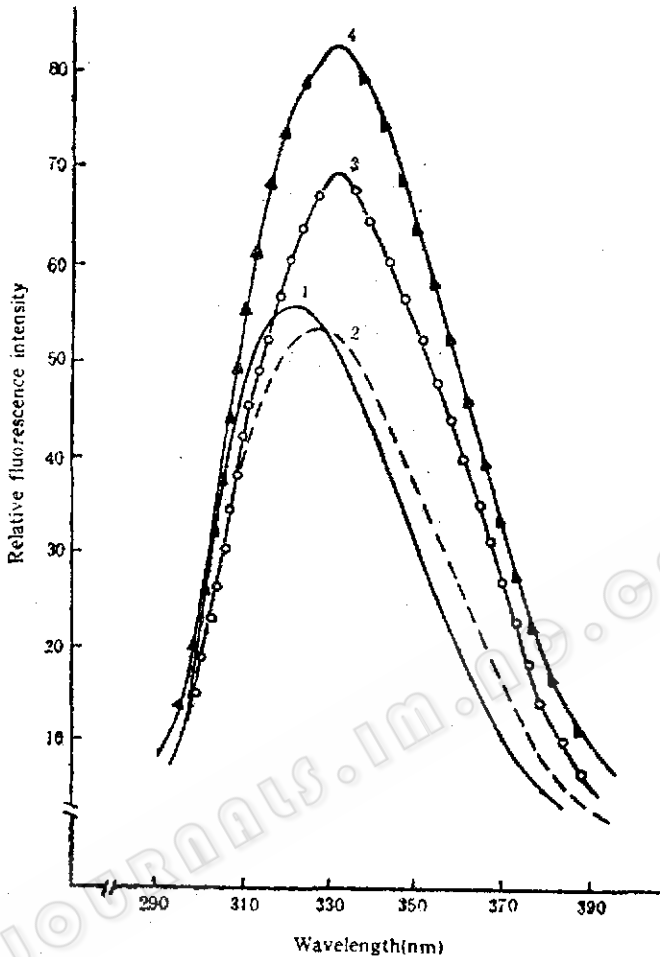


图 3 重组IL-2及其突变体的内源性荧光光谱

Fig. 3 Fluorescence analysis of rIL-2 and its analogs

1. wild type rIL-2; 2. ^{127}Pro -IL-2; 3. ^{125}Pro -IL-2; 4. ^{125}Pro - ^{127}Pro -IL-2

的破坏程度一致, 它们对生物活性的影响却相差很大, 这说明D螺旋 α 螺旋含量的变化不是影响IL-2活性的唯一因素。

荧光检测结果显示, D螺旋中引入Pro后, ^{121}Trp 微环境的疏水性减弱, 提示 ^{121}Trp 的空间位置发生了变化, 即从疏水核向分子表面移动。从图3中看出, 荧光主峰的红移程度: ^{125}Pro -IL-2 > ^{127}Pro -IL-2, 该结果说明 ^{121}Trp 位移的程度取决于D螺旋的破坏程度以及突变位点与 ^{121}Trp 的距离, 由此我们推测D螺旋被Pro破坏后, 突

点邻近残基的空间位置均受到不同程度的影响, 从而使两亲性螺旋中残基的正常排列次序被打乱。以往研究证明, IL-2分子N端A螺旋中 ^{20}Asp 是与IL-2R中 β 亚基结合的重要残基^[2], 其局部空间结构的稳定对IL-2的生物活性也至关重要。由于A、B、D三段螺旋空间位置接近^[1], 因此D螺旋的破坏可能削弱了其疏水面与A、B螺旋间的相互联系, 间接地影响了IL-2与受体的结合, 从而导致生物活性下降。因此我们认为D螺旋尤其是其疏水面的完整性是维持IL-2正常生物功能的重要

因素之

参 考 文 献

- [1] Mott, H.R. et al., *Biochemistry*, 21:7741, 1992.
- [2] Collins, L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 7709, 1988.
- [3] Ju, G. et al., *J. Biol. Chem.*, 262: 5723, 1987.
- [4] Liu, X. Y. et al., Annual Meeting of the International Society for Interferon Research, p.45, 1988.
- [5] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982.
- [6] 匡彦德等, 上海医科大学学报, 14: 10, 1987.
- [7] Landgraf, B. et al., *J. Biol. Chem.*, 264: 816, 1989.

Structure-Function Studies of the C-terminal α -Helix of Human Interleukin-2 by Site-Directed Mutagenesis

Xu Di Jiang Chunlei Shi Ying Yu Jianliang

Sun Lanying Fan Peifang Liu Xinyuan

(Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031)

By using oligonucleotide-mediated site-directed mutagenesis, three human Interleukin-2 analogs with substitution of Pro in the C-terminal amphiphilic α -helix: 125 Pro-IL-2, 127 Pro-IL-2 and 125 Pro- 127 Pro-IL-2 were obtained. The bioactivities of all these analogs were decreased. The extents of the decrease in bioactivity were coincident with the degrees of secondary and tertiary structure destroyed as evaluated by circular dichroism and intrinsic fluorescence analysis. The results suggested that the integrity of the hydrophobic face in F helix is crucial for the structure and function of Interleukin-2.

Key words Interleukin-2; structure-function analysis; mutagenesis