

文章编号: 1004-0374(2011)08-0790-06

一氧化氮合酶FMN结合结构域的电子传递及调控机制 研究现状

王瑞勇, 张璐, 柴亚辉, 吴静, 尹瑜静, 常俊标*
(郑州大学化学系, 郑州 45000)

摘要: 生物体内 NO 是在一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 催化下生成的, NOS 的结构包括 C 端还原酶域和 N 端加氧酶域。还原酶域中的 FMN 结合结构域既可接受来自 NADPH-FAD 结构域的电子, 又可作为提供电子的供体, 在调控催化过程中的电子传递方面发挥着重要作用。主要从 FMN 结合结构域的构象平衡及其对不同亚型 NOS 的动力学差异的贡献、FMN 结合结构域自身的电荷性质以及 NOS 中其他结构域对 FMN 结构域的功能调控三个方面进行了论述, 以期揭示 NOS 独特的电子传递催化机制。

关键词: 一氧化氮合酶; FMN 结合结构域; 电子传递

中图分类号: O629.23; Q55

文献标志码: A

Electron transfer and regulation mechanism of FMN subdomain in nitric oxide synthase

WANG Rui-Yong, ZHANG Lu, CHAI Ya-Hui, WU Jing, YIN Yu-Jing, CHANG Jun-Biao*
(Department of Chemistry, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: NO synthesis *in vivo* is catalyzed by nitric oxide synthase. Nitric-oxide synthase is composed of a C-terminal, flavin-containing reductase domain and an N-terminal, heme-containing oxidase domain. FMN domain plays a central role by acting as both an electron acceptor (receiving electrons from NADPH-FAD) and an electron donor (delivering electrons to the NOS heme). In the minireview, the following sections were presented: (i) a three-state, two-equilibrium model for the conformation of the FMN subdomain, in addition, its contribution to differences of nitric-oxide synthases I, II, and III from the view of kinetic, (ii) the surface charge of the FMN subdomain, (iii) how the partner subdomain (C-terminal residue and CaM binding) regulate the conformational equilibria of the FMN module in NOS. This helps to explain the unique electron transfer and catalytic behaviors of NOS.

Key words: nitric oxide synthase; FMN domain; electron transfer

一氧化氮 (NO) 作为一种细胞信使或神经递质, 在神经、心血管、呼吸、免疫、消化等系统中具有重要调节作用, 参与众多生理病理过程^[1-3]。通常痕量 NO 可作为生物信号分子参与多种信号传递, 而高浓度 NO 与一些疾病有关。因此, 在分子水平上揭示 NO 合成过程对促进人类健康研究具有重要意义。

生物体内 NO 是由 L-精氨酸 (L-Arg) 和分子氧在一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 催化下,

由还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 提供电子, 在黄素单核苷酸 (FMN)、黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 及四氢生物蝶呤 (H₄B)、血红素 (Heme)

收稿日期: 2011-03-14; 修回日期: 2011-05-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(20905065); 中国博士后科学基金项目(20100471004); 国家杰出青年科学基金项目(30825043)

*通信作者: E-mail: changjunbiao@zzu.edu.cn

等因子辅助下生成, 反应产物为 L- 脯氨酸、NO 和 NADP^+ 。NOS 的结构可分为加氧酶域和还原酶域^[4], N- 端加氧酶域由 Heme、 H_4B 、L-Arg 结合结构域组成, 其功能是结合底物 L-Arg 和维持酶分子的二聚体的结构, C 端还原酶域由 NADPH、FAD、FMN 结合结构域等组成, 起传递电子作用。在氧化酶域和还原酶域之间是一个钙调素 (calmodulin, CaM) 结合结构域。

NOS 有三种亚型结构, 分别为神经型 NOS (neuronal NOS, nNOS)、内皮型 NOS (endothelial NOS, eNOS) 和诱导型 NOS (inducible NOS, iNOS), 通过调控各区域内电子传递过程而发挥其作用^[5]。三种 NOS 具有不同的动力学、生化和生物特性, NOS 独立的加氧酶域和还原酶域能够分别单独表达和纯化, 通常仍保留原来的组成、结构、底物结合特性以及催化 NO 合成的能力, 这表明单独表达的 NOS 结构域能够折叠, 具有正常功能, 可分别作为对象研究。因此, 研究催化过程中的电子转移机制及各结构域在电子传递中的作用是热点之一^[6], 具有重要意义。

1 FMN结合结构域的构象平衡及其对不同亚型NOS的动力学影响

1.1 FMN结合结构域的构象平衡

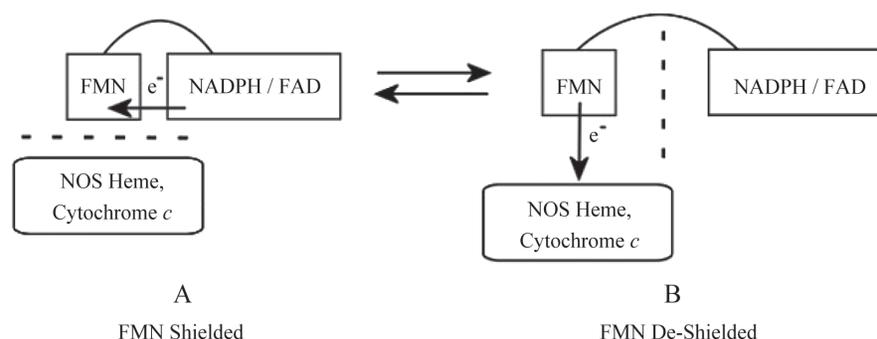
FMN结合结构域可作为转移至血红素的电子来源和贮藏处, 在 NO 合成中既可接受电子, 又可提供电子。NOS 还原酶域 (nitric oxide synthase reductase, NOSr) 包括 FMN 结合结构域和 NADPH/FAD 结合结构域, 两者之间由铰链连接, 其中 NADPH/FAD 结构域与铁氧化还原蛋白 -NADPH 还原酶 (FNR) 高度的相似^[7-8]。在 NOSr 中, NADPH

结构域为电子供体, 可提供 2 个电子, 电子从 NADPH 结构域转移至 FAD 结构域, 然后从 FAD 对苯二酚传递至 FMN 对苯二酚 (FMNH_2), 最后至血红素或其他外源性电子受体 (如细胞色素 C、细胞色素 P450 等)。电子传递至加氧酶域后, 使血红素结合氧和 L-Arg, 开始 NO 的合成过程。

NOSr 中 FMN 结合结构域有两种状态的构象平衡^[9-10](图 1), 可决定 FMN 结构域与电子供体 (NADPH/FAD 结构域) 和电子受体 (如 Heme) 相互作用的可能性及程度。第一种构象为 FMN 结合结构域被屏蔽状态 (图 1, A), 即 FMN 结构域与 NADPH/FAD 结构域发生作用, 接受 FAD 结构域提供的电子, 形成 FMN 对苯二酚型。第二种构象为 FMN 结合结构域未被屏蔽状态 (图 1, B), 即 FMN 结构域与 NADPH/FAD 结构域分离, 展现 FMN 结构域模块, 以使其继续传递电子至 NOS 加氧酶域或细胞色素 C。因此, NOSr 的稳态活性在一定程度上由以上两种构象的位置及动力学平衡决定, FMN 结合结构域的两构象还可调控 NOSr 的催化活性, 直接影响其还原细胞色素 C 的活性^[11]。

1.2 FMN结合结构域对不同亚型NOS的动力学影响

在 NO 合成过程, NOS 的催化行为是复杂、多步骤的, 主要由 Heme 的还原速率 (K_r)、 Fe^{III} Heme-NO 复合物的离解速率 (K_d) 和 Fe^{II} Heme-NO 的氧化速率 (K_{ox}) 决定^[12], 这三个基本参数反映了三种不同亚型的 NOS 动力学上的最大区别。对 nNOS 来说, 较于 K_d 和 K_{ox} , 其较大的 K_r 决定了在稳态 NO 合成中 nNOS 主要以 Fe^{II} -NO 的形式存在; 对 eNOS 来说, 其较小的 K_r 决定了 eNOS 主要存在形式为 Fe^{III} ; 而 iNOS 适中的 K_r 和 K_{ox} 决定了 iNOS 的存在形式为两者并存。NOS 的催化过程由两个循环组



A: FMN结合结构域被屏蔽构象, 作为电子受体, 接受NADPH/FAD结构域提供的电子; B: FMN结合结构域未被屏蔽构象, 作为电子供体, 传递电子至血红素或细胞色素C。

图1 NOSr中FMN域的构象平衡^[11]

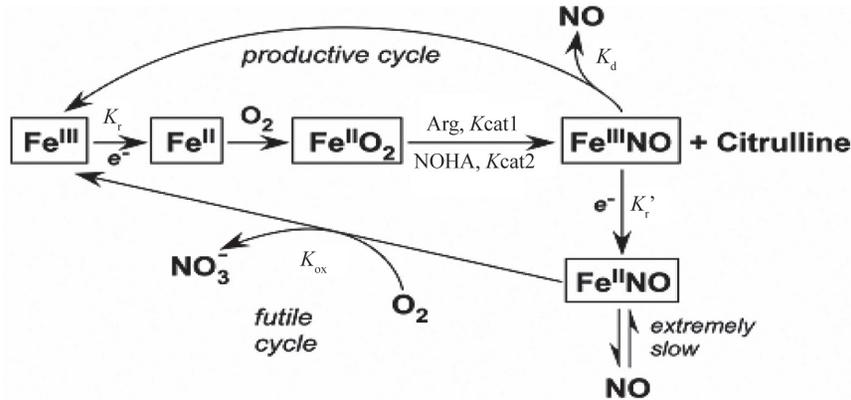
成(图2),一为有效循环,包括所有产生NO的步骤;二为无效循环,包括NO与Heme结合形成复合物,Heme-NO复合物的离解或氧化,产生硝酸盐和活性酶的过程^[13-14]。

电子从eNOS的FMN结构域传递到Heme的速率比nNOS或iNOS小12.5%~25%,在CaM存在或不存在两种条件下,eNOS的细胞色素C还原酶活性比nNOS的小10%左右。通过交换还原酶区域来构建NOS嵌合体酶的研究结果表明,血红素的还原速率限制了eNOS的活性,是NO合成中的限速步骤^[15]。Santolini等^[16]通过构建动力学模型,对突变型nNOS和野生型nNOS的前稳态和稳态活性进行了比较,研究了血红素的还原速率如何影响nNOS的催化特征(如Heme-NO的形成、

K_{m,O_2} 、NO的合成速率等)。Chen和Wu^[17]发现缺失自抑制片段(残基1165~1178)的eNOS与野生型eNOS相比,细胞色素C还原酶活性增强了2倍,而nNOS的相应活性则减弱。Haque等^[12]发现FMN结构域中的E762N残基使 Fe^{II} Heme-NO复合物的形成降至最少,其较小的 K_r 和较大的 K_{ox} 导致了 K_{m,O_2} 的减小。

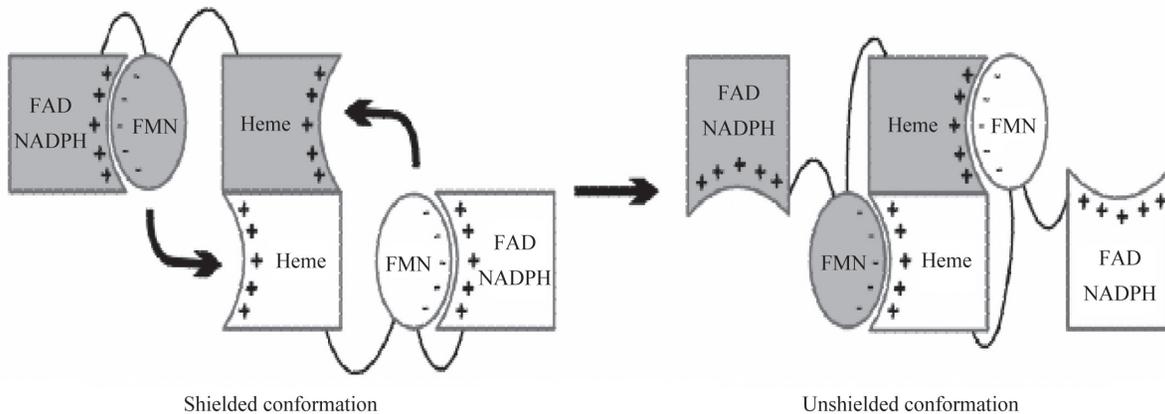
2 FMN结合结构域的表面电荷性质研究

FMN结合结构域在NOS催化电子转移过程中作为一把“双刃剑”,既可提供电子,又可接受电子^[18](图3)。晶体结构研究表明,FMN结合结构域表面带有负电荷^[19],而与其相互作用的基团表面带有正电荷,说明电荷的中和作用是反应发生的重要



K_r : 血红素的还原速率; K_{cat1} 和 K_{cat2} 为 $Fe^{II}O_2$ 分别与L-Arg和NOHA作用的速率,形成的 $Fe^{III}NO$ 复合物可释放出NO(K_d),为有效循环; $Fe^{III}NO$ 被还原为 $Fe^{II}NO$ (K_r'), $Fe^{II}NO$ 与 O_2 发生氧化反应(K_{ox})产生 NO_3^- 和活性酶,为无效循环。

图2 NOS催化动力学模型^[13]



FMN结构域表面带负电荷,与其相互作用的NADPH/FAD结构域(图左,FMN被屏蔽构象)和Heme结构域(图右,FMN未被屏蔽构象)表面均带正电荷,形成电荷配对。

图3 nNOS各结构域间的静电作用及构象平衡^[19]

因素^[18,20-21]。Panda等^[21]利用定点突变方法研究了在nNOS中FMN结构域的6个负电荷残基的电子转移和催化机制,发现中和或改变每个残基的电负性都会改变NADPH结构域的氧化过程、血红素的还原速率及nNOS的细胞色素C还原酶活性。Tejero等^[18]采用停流技术和稳态实验研究了在FMN结构域与NOS加氧酶域(nitric oxide synthase oxygenase, NOSoxy)传递电子过程中,NOSoxy结构域中的8个正电荷残基的作用,发现Lys⁴²³、Lys⁶²⁰、Lys⁶⁶⁰这三者间的静电相互作用激活nNOS中血红素的还原和NO的合成,利于FMN结构域和NOSoxy结构域间的电子传递。

在电子传递过程中,FMN主要有三种存在形式:氧化型(ox)、一电子还原型(FMN半醌, sq)和二电子还原型(FMN对苯二酚, hq)。因sq/hq的氧化还原电位(-180 mV)低于ox/sq(+70 mV)^[22],故FMN半醌不能还原Heme,电子只能从FMN对苯二酚型传递至Heme,这是NO合成中的限速步骤^[13]。而与NOS结构及功能均相似的细胞色素P450BM3,其FMN半醌可直接还原Heme^[23],这种区别可归因于NOS中FMN结合结构域中的残基Gly和Asn的存在。Li等^[24]通过移除FMN结构域中的Gly⁸¹⁰残基的方法使ox/sq的氧化还原电位低于sq/hq,表明Gly⁸¹⁰残基在增强nNOSr的FMN结构域半醌稳定性方面起着重要的作用。

3 NOS中其他结构域对FMN结合结构域构象及功能的影响

3.1 C-端残基对FMN结合结构域构象及功能的影响

nNOSr晶体结构清晰表明,C端尾部或其附近的残基可调控FMN结构域的构象自由度,通过与NADPH结合结构域的连接作用使FMN结合结构域趋于被屏蔽构象状态。NADPH中的烟碱基团可与FAD的异咯嗪环相互作用,其中2',5'-ADP基团与NADPH/FAD结构域中保存的残基具有离子及氢键作用,是影响NADPH稳定作用的重要因素。无CaM存在的nNOSr中,NADPH结构域可通过阻止或降低FMN结构域接受电子的能力,使nNOSr保持FMN结构域被屏蔽的构象,从而抑制电子传递至细胞色素C^[25]。

Tiso等^[9]指出C端残基Arg¹⁴⁰⁰可通过与NADPH中的2'-磷酸基团相互作用,稳定FMN结构域使其处于被屏蔽构象,影响电子传递过程。Konas等^[11]和Ilagan等^[7]分别报道了残基Phe¹³⁹⁵的芳香氨基

酸侧链可阻止稳态中NADP⁺的释放,便于FAD与NADPH中的烟碱基团有效地相互作用,促进氢负离子转移至FAD,从而稳定FMN结构域被屏蔽构象,抑制细胞色素C的还原速率。Panda等^[10]采用定点突变的方法用Val、Asn、Glu代替nNOS中的残基Asp¹³⁹³,结果表明Asp¹³⁹³的羧酸酯侧链是nNOS黄素酶依赖于NADPH结合结构域还原反应发生的关键性因素。

3.2 CaM结合结构域对FMN结合结构域构象及功能的影响

CaM结合结构域位于N-端加氧酶域和C-端还原酶域之间,nNOS和eNOS可在细胞中表达并与CaM可逆地结合、分离,其活性受Ca²⁺和CaM影响。因此,细胞内Ca²⁺的水平可调节它们的活性。与此相反,iNOS与CaM的结合不受Ca²⁺影响,表达后活性不变。Ca²⁺结合于nNOS中心部位的Ca²⁺/CaM,作为变构机制,使nNOS的C末端还原酶域与N末端加氧酶域发生重排,而促进电子从黄素辅基传递至血红素。

CaM结合结构域通过影响两个可能的电子转移步骤:NADPH → FAD, FAD → FMN来调控黄素辅基到血红素之间的电子传递^[26]。CaM可减少电子从NOS黄素酶域至外源性电子受体(细胞色素C)的抑制程度,其结合于NOS可使电子从FMN传递至血红素,从而引起NO的合成反应,这些特征在NOS独特的调控机制中起着重要作用。

Craig等^[25]的研究表明,还原酶域由于构象被锁定不能有效地传递电子,CaM改变FMN结构域的空间位置从而利于FMN结构域未被屏蔽构象的稳定,有效地促进电子转移至细胞色素C。Fu等^[27]的研究表明,在CaM存在下,FADH₂-FMN和FADH-FMNH·的电子传递很快;而无CaM时,半醌的形成速率慢,说明了Ca²⁺/CaM促进了FAD结构域至FMN结构域间的电子传递。Tejero等^[28]对FMN结构域的Arg⁷⁵²和CaM结构域的Glu⁴⁷残基突变后得到的nNOS作了研究,结果表明Arg⁷⁵²-Glu⁴⁷的相互作用是CaM能够活化nNOS的重要特征,CaM影响FMN结构域与NADPH/FAD结构域、Heme结构域之间的电子传递。

4 结语

FMN结合结构域在电子传递和NO合成中扮演着重要角色^[29-30],电子通过其在同型二聚体内传递,也可由FMN结合结构域直接传递到外源性电

子受体, 可通过屏蔽和去屏蔽两种构象调控电子传递。FMN 结合结构域可影响三种不同亚型 NOS 的动力学参数, 在电子传递过程中 FMN 结合结构域的三种存在形式及表面电荷性质则通过电化学手段进行研究。C 端残基和 CaM 结构域对 FMN 结构域都有重要影响, 表现为 C 端残基可与 NADPH 的连接, 从而稳定 FMN 结构域被屏蔽构象, 抑制细胞色素 C 的还原酶活性; CaM 结构域则起相反的作用, 促进电子从 FMN 结构域传递至血红素 (或细胞色素 C), 引发 NO 的合成反应。FMN 结合结构域的电子传递调控机制及在 NOS 中发挥怎样的作用仍将是以后研究热点, 对其进行研究可为全方位认知 NOS 复杂的催化行为和 NO 合成的反应机理提供理论基础, 具有重要意义。

[参 考 文 献]

- [1] Yetik-Anacak G, Catravas JD. Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. *Vasc Pharmacol*, 2006, 45(5): 268-76
- [2] Conti A, Miscusi M, Cardali S, et al. Nitric oxide in the injured spinal cord: synthases cross-talk, oxidative stress and inflammation. *Brain Res Rev*, 2007, 54 (1): 205-18
- [3] Reeves SR, Simakajornboon N, Gozal D, et al. The role of nitric oxide in the neural control of breathing. *Respir Physiol Neurobiol*, 2008, 164(1-2): 143-50
- [4] Zhou L, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide*, 2009, 20(4): 223-30
- [5] Sempombe J, Elmore BO, Sun X, et al. Mutations in the FMN domain modulate MCD spectra of the heme site in the oxygenase domain of inducible nitric oxide synthase. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(20): 6940-1
- [6] Ilagan RP, Tiso M, Konas DW, et al. Differences in a conformational equilibrium distinguish catalysis by the endothelial and neuronal nitric-oxide synthase flavoproteins. *J Biol Chem*, 2008, 283(28): 19603-15
- [7] Ilagan RP, Tejero J, Aulak KS, et al. Regulation of FMN subdomain interactions and function in neuronal nitric oxide synthase. *Biochemistry*, 2009, 48(18): 3864-76
- [8] Zhang J, Martasek P, Paschke R, et al. Crystal structure of the FAD/NADPH-binding domain of rat neuronal nitric-oxide synthase comparisons with NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. *J Biol Chem*, 2001, 276(40): 37506-13
- [9] Tiso M, Konas DW, Panda K, et al. C-terminal tail residue Arg1400 enables NADPH to regulate electron transfer in neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 2005, 280(47): 39208-19
- [10] Panda K, Haque MM, Garcin-Hosfield ED, et al. A conserved aspartate (Asp-1393) regulates NADPH reduction of neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 2003, 279(18): 18323-33
- [11] Konas DW, Zhu K, Sharma M, et al. The FAD-shielding residue Phe¹³⁹⁵ regulates neuronal nitric-oxide synthase catalysis by controlling NADP⁺ affinity and a conformational equilibrium within the flavoprotein domain. *J Biol Chem*, 2004, 279(34): 35412-25
- [12] Haque MM, Fadlalla M, Wang ZQ, et al. Neutralizing a surface charge on the FMN subdomain increases the activity of neuronal nitric-oxide synthase by enhancing the oxygen reactivity of the enzyme heme-nitric oxide complex. *J Biol Chem*, 2009, 284(29): 19237-47
- [13] Stuehr DJ, Santolini J, Wang ZQ, et al. Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *J Biol Chem*, 2004, 279(35): 36167-70
- [14] Abu-Soud HM, Ichimori K, Presta A, et al. Electron transfer, oxygen binding, and nitric oxide feedback inhibition in endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 2000, 275(23): 17349-57
- [15] Nishida CR, Ortiz de Montellano PR. Electron transfer and catalytic activity of nitric oxide synthases: chimeric constructs of the neuronal, inducible, and endothelial isoforms. *J Biol Chem*, 1998, 273(10): 5566-71
- [16] Santolini J, Adak S, Curran CML, et al. A kinetic simulation model that describes catalysis and regulation in nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 2001, 276(2): 1233-43
- [17] Chen PF, Wu KK. Structural elements contribute to the calcium/calmodulin dependence on enzyme activation in human endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 2003, 278(52): 52392-400
- [18] Tejero J, Hannibal L, Mustovich A, et al. Surface charges and regulation of FMN to heme electron transfer in nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 2010, 285: 27232-40
- [19] Garcin ED, Bruns CM, Lloyd SJ, et al. Structural basis for isozyme-specific regulation of electron transfer in nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 2004, 279(36): 37918-27
- [20] Shimanuki T, Sato H, Daff S, et al. Crucial role of Lys⁴²³ in the electron transfer of neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 1999, 274(38): 26956-61
- [21] Panda K, Haque MM, Garcin-Hosfield ED, et al. Surface charge interactions of the FMN module govern catalysis by nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 2006, 281(48): 36819-27
- [22] Ghosh DK, Holliday MA, Thomas C, et al. Nitric-oxide synthase output state. design and properties of nitric-oxide synthase oxygenase/FMN domain constructs. *J Biol Chem*, 2006, 281(20): 14173-83
- [23] Gao YT, Smith SME, Weinberg JB, et al. Thermodynamics of oxidation-reduction reactions in mammalian nitric-oxide synthase isoforms. *J Biol Chem*, 2003, 279(18): 18759-66
- [24] Li HY, Das A, Sibhatu H. Exploring the electron transfer properties of neuronal nitric-oxide synthase by reversal of the FMN redox potential. *J Biol Chem*, 2008, 283(50): 34762-72
- [25] Craig DH, Chapman SK, Daff S. Calmodulin activates electron transfer through neuronal nitric-oxide synthase reductase domain by releasing an NADPH-dependent conformational lock. *J Biol Chem*, 2002, 277(37): 33987-

- 94
- [26] Guan ZW, Kamatani D, Kimura S, et al. Mechanistic studies on the intramolecular one-electron transfer between the two flavins in the human neuronal nitric-oxide synthase and inducible nitric-oxide synthase flavin domains. *J Biol Chem*, 2003, 278(33): 30859-68
- [27] Fu J, Yamamoto K, Guan ZW, et al. Human neuronal nitric oxide synthase can catalyze one-electron reduction of adriamycin: role of flavin domain. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 427 (2): 180-7
- [28] Tejero J, Haque MM, Durra D, et al. A bridging interaction allows calmodulin to activate neuronal nitric oxide synthase through a bimodal mechanism. *J Biol Chem*, 2010, 285 (34): 25941-9
- [29] Dunford AJ, Rigby SEJ, Hay S, et al. Conformational and thermodynamic control of electron transfer in neuronal nitric oxide synthase. *Biochemistry*, 2007, 46(17): 5018-29
- [30] Feng CJ, Thomas C, Michael A, et al. Direct measurement by laser flash photolysis of intramolecular electron transfer in a two-domain construct of murine inducible nitric oxide synthase. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(11): 808-11