

大肠杆菌外膜蛋白 OmpF 结构研究进展

赵志平¹, 聂鑫^{1,2}, 李再新¹, 张智¹, 谢万如¹, 王艺军¹

(1. 四川理工学院化学与制药工程学院, 四川 自贡 643000; 2. 重庆大学生物工程学院, 重庆 400044)

摘要: OmpF 是大肠杆菌最重要的外膜蛋白之一, 它形成的离子通道是大肠杆菌与外界进行物质交换的重要通道, 能够使分子量不超过 600 Da 的水溶性物质通过该离子通道穿越外膜。OmpF 外膜蛋白与大肠杆菌的耐药性、抗酸性以及抗渗透压等生理活动密切相关。OmpF 的功能与其结构特征密不可分。阐述了大肠杆菌外膜蛋白 OmpF 及其组成元件 Loop 3 环的结构特征。

关键词: 大肠杆菌; 外膜蛋白; OmpF; Loop 3

中图分类号: Q81

文献标识码: A

革兰氏阴性细菌外膜蛋白对细菌抵抗有害物质或环境起着重要作用, 它能够保护细胞免受或减少多种有害物质的影响, 如蛋白酶、抗生素、毒素和噬菌体等^[1], 并且对维持革兰氏阴性细菌在高渗透压、酸性等胁迫条件下的生存起着重要作用^[2,4]。此外, 外膜蛋白形成的非特异性的离子通道对革兰氏阴性细菌吸收营养物质和排泄自身代谢废物也起着关键作用^[5]。外膜蛋白也被称为膜孔蛋白, 是外膜的主要组成成分, 大肠杆菌重要的外膜蛋白有 OmpC、OmpF 和 PhoE 等^[6-7], 它们横跨脂质双分子层。外膜蛋白 OmpF 是大肠杆菌主要的膜孔通道, 允许不超过 600 Da 的小分子水溶性物质通过细胞膜, 也是抗生素进入细胞的主要通道^[8]。OmpF 这些重要的生物功能和其结构有着密不可分的关系。

1 OmpF 的结构特征

目前, OmpF 蛋白是研究得最为清楚的蛋白之一。1991 年, Weiss 等^[9]首次报道了光合细菌 *Rhodobacter capsulatus* 一个膜孔蛋白的结构特征, 并证实该膜孔蛋白的结构是 16 条反并联的 β -桶(anti-parallel β -barrel) 结构组成^[10]。1992 年, Cowan 等研究表明, 大肠杆菌 OmpF 和 *Rb. sphaeroides* 外膜蛋白 OmpF 具有相似的结构, 也是由 16 条反并联的 β -桶结构组成, 包含 8 条长环(long

loop) 和 8 条短转角(short turn)。其中, 8 条短转角包括 T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7 和 T8, 分布在 β -桶的胞质端。8 条长环包括 L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7 和 L8, 分布在细胞外端^[11]。L1、L4~L8 等 6 条环包裹得比较紧密, 大肠杆菌 OmpF 通常是一个具有阳离子选择性的三聚体, 总长度大约是 5 nm, 直径大约是 12 Å, 并且每个单体之间呈几何对称, 如图 1 所示(PDB 数据库, 登陆代码 3HWB), 每个单体由大约 340 个氨基酸组成^[12]。16 个 β -链的长度范围是 7~16 个氨基酸, 各个单体结构的稳定性由疏水性和极性相互作用决定。其中, L2 环对维持 OmpF 三聚体和各个单体的稳定性起着重要作用^[13]。

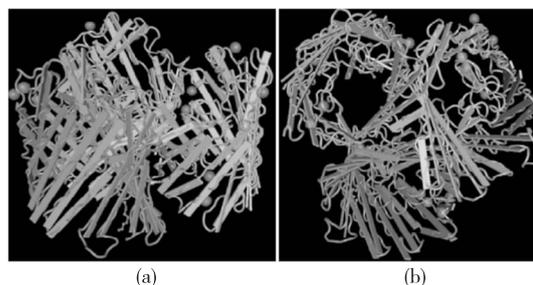


图 1 大肠杆菌 K-12 MG1655 菌株外膜蛋白 OmpF 的三维结构

注: 每个 OmpF 三聚体包含 3 个单体, 分辨率为 1.59 Å。
(a) 是侧视图, (b) 是俯视图。(PDB 数据库)

收稿日期: 2011-12-20

基金项目: 四川省教育厅项目(11ZB102); 四川理工学院人才引进项目(2011RC12)

作者简介: 赵志平(1981-), 男, 山东东明人, 讲师, 博士, 主要从事蛋白疫苗和膜蛋白的表达纯化方面的研究, (E-mail) zhaozhiping10023@yahoo.com.cn

在不同的包装环境下, OmpF 可以呈现出不同的空间结构。1995 年, Cowan 等^[14]研究表明, OmpF 也能以四角形晶体的形式存在, 每个对称单元包括 2 个三聚体(分辨率 3.2 Å)。无论是三角形晶体还是四角形晶体, 三聚体的结构相同。用新型去垢剂纯化 OmpF 也是 OmpF 结构研究的一个重要方面。2010 年, Kefala 等^[15]第一次用浓度为 5 mM 的两性离子型去垢剂 FC12(foscholine-12)从大肠杆菌中纯化了 OmpF, 得到了两种不同的晶体结构。第一种晶体结构的分辨率是 3.8 Å, 细胞参数分别为 $a = 136.7 \text{ \AA}$, $b = 210.5 \text{ \AA}$, $c = 137 \text{ \AA}$, $\beta = 100.5^\circ$ 。第二种晶体结构的分辨率是 4.4 Å, 细胞参数分别为 $a = 215.5 \text{ \AA}$, $b = 215.5 \text{ \AA}$, $c = 137.5 \text{ \AA}$, $\gamma = 120^\circ$ 。用两性离子型去垢剂 FC12 获得的 OmpF 的两种晶体结构都是全新的晶体结构, 和前人的研究结果有所不同, 它们都是四面体的结构, 且每个四面体都含有 4 个三聚体, 如图 2 所示。



图 2 FC-12 去垢后得到的 OmpF 的四面体结构

目前, 所得到的 OmpF 的晶体结构只有三角形和四角形两种结构, 这两种结构中每个单体的结构是相同的, 都含有 16 个 β -链, 分布区域分别是 23 - 28 aa、30 - 45 aa、61 - 73 aa、76 - 88 aa、105 - 113 aa、116 - 122 aa、157 - 163 aa、172 - 181 aa、194 - 204 aa、206 - 217 aa、233 - 244 aa、246 - 257 aa、275 - 287 aa、290 - 303 aa、328 - 337 aa (数据来源: UniProtKB/Swiss - Prot: P02931)。

2 OmpF 蛋白 Loop3 的功能

在 L1 - L8 等 8 条长环中, L3 环是目前研究最广泛和最为透彻长环, 在大肠杆菌的耐药性、抗酸性、抗渗透压、离子选择性、离子电导等方面起着最为重要的作用^[16-17]。L3 环与其它 5 个环不同, 它并不是暴露在细胞的表面, 而是折叠到 β -桶的内部, 形成类似环面的狭窄

区带^[18]。

L3 的氨基酸残基区域是 103 - 134, 该区域包含有天冬氨酸残基 (Asp107、Asp113、Asp121、Asp126 和 Asp127)、谷氨酸残基 (117)^[16]。1991 年, Jeanteur 等报道了 L3 包含的一个序列基序, 即 PEFGG, 该基序在肠道菌膜孔蛋白中非常保守^[19]。1998 年, Bainbridge 等^[17]通过定点突变技术研究了 5 个 OmpF 半胱氨酸突变体在大肠杆菌素 N 和 A 转位过程中的作用, 并且发现 5 个突变体并没有发生构型上的变化, 这 5 个半胱氨酸残基对维持 OmpF L3 环转移大肠杆菌素的作用不是必须的。2001 年, Phale 等^[20]研究表明 OmpF L3 环中两个酸性氨基酸残基 D113 和 E117 对 OmpF 膜蛋白的离子电导、离子选择等方面起着重要的作用, D113 和 E117 突变为 N113 和 Q117 后可以使得 OmpF 离子通道的电导降低 2 倍。2003 年, Bredin 等^[8]研究发现, OmpF L3 环对 OmpF 孔蛋白结构的一个重要特征, 决定着 OmpF 孔蛋白的离子通道的大小和静电学特征; 大肠杆菌素 A 和 N、精胺和抗生素进入细胞内部都与 OmpF L3 环有直接关系, D113 和 D121 氨基酸残基发挥着不可或缺的作用。2007 年, Begic 和 Worobec 通过定点突变技术研究发现, L3 中 G124 氨基酸残基对 OmpF 孔蛋白的大小和离子选择性都起着重要的作用。2008 年, Yamashita 等^[21]通过共结晶技术研究了 OmpF 和大肠杆菌素的相互作用, 晶体分辨率为 1.6 Å, 该共结晶体中含有大肠杆菌素, 并且大肠杆菌素与 OmpF 相互作用位置在 L3 环 Asp113 和 Glu117 氨基酸残基之间。同时, 研究表明, L3 环是 OmpF 孔蛋白发挥其复杂作用的关键位置。在 Mg^{2+} 存在的情况下结晶, Mg^{2+} 也插入到 L3 环 Asp113 和 Glu117 氨基酸残基之间, 但 Mg^{2+} 和 L3 环作用力较大肠杆菌素小, 可以被大肠杆菌素取代。通过定点突变和结晶技术研究 L3 环的功能仍是研究的热点和重点。

3 OmpF 的一级结构分析

OmpC、OmpF 和 PhoE 是大肠杆菌最重要的外膜孔蛋白^[7], 它们的合成与脂多糖 LPS 的密切相关, 并且受 LPS 合成的影响^[22-25]。OmpF 与 OmpC 和 PhoE 的氨基酸序列有较高的相似性, 同源性约 60%, 如图 3 所示 (DNAMAN 软件分析)。三个外膜孔蛋白中都含有保守的氨基酸基序 PEFGG 基序, 如图 3 中方框标记所示。利用 Genebank 数据库 BLAST 分析表明, OmpF 外膜孔蛋白的一级结构都非常保守。从感病兔肠道中分离的耐药性大肠杆菌中 PCR 扩增的 OmpF 基因同样具有非常

高的同源性。

OmpF	HEKRNILAVIPVALLVAGTANAAEIVYKDKGNKVDLYGKAVGLHYFSGKNGENSYGGNDM	60
PhoE	.HKSTLALVWVGIVASVQAAEIVYKDKGNKVDLYGKAVGLHYFSGKNGENSYGGNDM	54
OmpC	.HKRVVLSLLVWVAGVAAEIVYKDKGNKVDLYGKAVGLHYFSGKNGENSYGGNDM	54
Consensus	l v aae ynkdgkn d yk hy s gd	
OmpF	TYARLGFKEGTQINSDLTGVGQNEVYFQGNNSGADAOQGNKTRLAFAGLKYAVGSEFDY	120
PhoE	SYIRFGFKEGTQINDQLTGVGQNEAEFAGNKAESDTAGQ...KTRLAFAGLKYAVGSEFDY	112
OmpC	TYMRLGFKEGTQVTDQLTGVGQNEVYFQGNNSGADAOQGNKTRLAFAGLKYAVGSEFDY	111
Consensus	r gfkgetq ltygy we qn e tr afaglk d qsfgy	
OmpF	GRNIVGVVYDALGYDHLPEFGGDT.AYSDFFVGRVGVVATYRNSNFFGLVDGLNFAVQY	179
PhoE	GRNLGALYDVEAWDFPEFGGDTAIDFHTFRASGLATTENTDFFGVIDGLNLTQY	172
OmpC	GRNIVGVVYDVTVDLPEFGGDT.YGSDNFRQCGNGFATYRNTDFFGVIDGLNFAVQY	170
Consensus	gn g yd td pefggd d f r g atyrc ffg dgin qy	
OmpF	LGKNER.....DTARRSNGDVGGSISYEYEG...FCIVGAYGAADRINLQE	223
PhoE	QGNEN.....RDVRRKNGDVGGSITLTYDFGSDFAISGAYTNSDRINENQ	218
OmpC	QGNINPSEGFSTGVTTNGRDLRONGDVGGSITLTYDFGSDFAISGAYTNSDRINENQ	228
Consensus	gnk n d tarrsngdvggsisye yeg . fcivg aygaadrinlqe	
OmpF	.AGPLNGKKAQNAATGKTDANNIYLAAAYTETRNAPITNKFNTSGFANKTQVLLV	282
PhoE	.LQSRGTVRRAEATSLKTDANNIYLATFSEETRNPTT.....GGFANKTQVLEAF	271
OmpC	TAAYTNGSDRAETTYGKTDANNIYLAAAYTETRNAPITNKFNTSGFANKTQVLLV	283
Consensus	g g ae gkydanniyla y t t g ank q v	
OmpF	AGYQDFGLRPSLIAYTSEKAKDV.EGIGDVLVNVFVVGATYFFNKNMSTYVDYIENQID	341
PhoE	AGYQDFGLRPSLGYLSEKAKDI.EGIGDVLVNVFVVGATYFFNKNMSTYVDYIENQID	330
OmpC	AGYQDFGLRPSLAIYLSKAKDVEGIGDVLVNVFVVGATYFFNKNMSTYVDYIENQID	343
Consensus	agqydfglrpsly sk k g dd y vgyatyrnkms vdy in d	
OmpF	SD...NKLGVGSEDIVAVGIVYQ	361
PhoE	SD...NKLININDIVAVGIVYQ	350
OmpC	DNQFTRDAGINTDVALGLVYQ	366
Consensus	d va g yq	

图3 大肠杆菌 K12 MG1655 菌株外膜孔蛋白 OmpC、OmpF 和 PhoE 的一级结构同源性分析

4 展望

目前,大肠杆菌的耐药性受到研究者的高度、广泛重视,耐药性的产生给大肠杆菌疾病防治带来了严峻的考验,给畜牧业生产和医疗卫生事业等带来了严重危害,也危害到人类的健康。通过研究大肠杆菌外膜孔蛋白的结构,利用定点突变技术研究外膜孔蛋白的某些重要氨基酸的功能以及外膜孔蛋白结构的变化,充分阐述大肠杆菌的耐药机制并加以利用仍是今后研究的重点和热点。

参考文献:

[1] Cascales E,Buchanan S K,Duche D,et al.Colicin biology [J].Microbiol Mol Biol Rev,2007,71(1):158-229.

[2] Nikaido H,Vaara M.Molecular basis of bacterial outer membrane permeability[J].Microbiol Rev,1985,49(1):1-32.

[3] Bekhit A,Fukamachi T,Saito H,et al.The role of OmpC and OmpF in acidic resistance in *Escherichia coli*[J].Biol Pharm Bull,2011,34(3):330-334.

[4] Queralt-Martin M,Garcia-Gimenez E,Mafe S,et al.Divalent cations reduce the pH sensitivity of OmpF channel inducing the pK(a) shift of key acidic residues[J].Phys Chem Chem Phys,2010,13(2):563-569.

[5] Nikaido H.Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited[J].Microbiol Mol Biol Rev,2003,67(4):593-656.

[6] Fourel D,Hikita C,Bolla J M,et al.Characterization of

ompF domains involved in *Escherichia coli* K-12 sensitivity to colicins A and N[J].J Bacteriol,1990,172(10):3675-3680.

[7] Pages J M,James C E,Winterhalter M.The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria[J].Nat Rev Microbiol,2008,6(12):893-903.

[8] Bredin J,Simonet V,Iyer R,et al.Colicins,spermine and cephalosporins:a competitive interaction with the OmpF eyelet[J].Biochem J,2003,376(Pt 1):245-252.

[9] Weiss M S,Abele U,Weckesser J,et al.Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin [J].Science,1991,254(5038):1627-1630.

[10] Weiss M S,Schulz GE.Structure of porin refined at 1.8 Å resolution[J].J Mol Biol,1992,227(2):493-509.

[11] Cowan S W,Schirmer T,Rummel G,et al.Crystal structures explain functional properties of two *E.coli* porins [J].Nature,1992,358(6389):727-733.

[12] Pezeshki S,Chimerel C,Bessonov A N,et al.Understanding ion conductance on a molecular level:an all-atom modeling of the bacterial porin OmpF[J].Biophys J,2009,97(7):1898-1906.

[13] Schulz G E.The structure of bacterial outer membrane proteins[J].Biochim Biophys Acta,2002,1565(2):308-317.

[14] Cowan S W,Garavito R M,Jansonius J N,et al.The structure of OmpF porin in a tetragonal crystal form [J].Structure,1995,3(10):1041-1050.

[15] Kefala G,Ahn C,Krupa M,et al.Structures of the OmpF porin crystallized in the presence of foscholine-12[J].Protein Sci,2010,19(5):1117-1125.

[16] Dhakshnamoorthy B,Raychaudhury S,Blachowicz L,et al.Cation-selective pathway of OmpF porin revealed by anomalous X-ray diffraction[J].J Mol Biol,2009,396(2):293-300.

[17] Bainbridge G,Armstrong G A,Dover L G,et al.Displacement of OmpF loop 3 is not required for the membrane translocation of colicins N and A in vivo [J].FEBS Lett,1998,432(3):117-122.

[18] Koebnik R,Locher K P, Van Gelder P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins:barrels in a nutshell[J].Mol Microbiol,2000,37(2):239-253.

[19] Jeanteur D,Lakey J H,Pattus F.The bacterial porin su-

- perfamily:sequence alignment and structure prediction [J].Mol Microbiol,1991,5(9):2153-2164.
- [20] Phale P S, Philippsen A, Widmer C, et al. Role of charged residues at the OmpF porin channel constriction probed by mutagenesis and simulation[J]. Biochemistry,2001,40(21):6319-6325.
- [21] Yamashita E,Zhalnina M V,Zakharov S D,et al.Crystal structures of the OmpF porin: function in a colicin translocon[J].EMBO J,2008,27(15):2171-2180.
- [22] Bolla J M,Lazdunski C,Pages J M.The assembly of the major outer membrane protein OmpF of *Escherichia coli* depends on lipid synthesis[J]. EMBO J,1988,7(11):3595-3599.
- [23] Ried G,Hindennach I,Henning U.Role of lipopolysaccharide in assembly of *Escherichia coli* outer membrane proteins OmpA,OmpC,and OmpF[J].J Bacteriol, 1990,172(10):6048-6053.
- [24] Yu F,Mizushima S.Roles of lipopolysaccharide and outer membrane protein OmpC of *Escherichia coli* K-12 in the receptor function for bacteriophage T4 [J].J Bacteriol,1982,151(2):718-722.
- [25] Hagge S O,de Cock H,Gutsmann T,et al.Pore formation and function of phosphoporin PhoE of *Escherichia coli* are determined by the core sugar moiety of lipopolysaccharide[J]. J Biol Chem, 2002, 277 (37): 34247-34253.

Progresses on Structure of Outer Membrane Protein OmpF from *Escherichia Coli*

ZHAO Zhi-ping¹, NIE Xin^{1,2}, LI Zai-xin¹, ZHANG Zhi¹, XIE Wan-ru¹, WANG Yi-jun¹

(1. School of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China; 2. School of Biotechnology Engineering of Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: OmpF is the one of the most important outer membrane proteins of *Escherichia coli*. The ion channel formed by OmpF is the main passage for substance exchange of *Escherichia coli* with the environment, which allows hydrophilic solutes with molecular mass up to 600 Da across the outer membrane. OmpF plays crucial roles in the drug resistance, anti-acidic resistance and anti-osmotic pressure of *Escherichia coli*, which is closely related with the structure of OmpF. The present review describes the structure properties of the outer membrane protein OmpF and its component Loop 3.

Key words: *Escherichia coli*; outer membrane protein; OmpF; Loop 3