

# 甘油脱水酶的理性设计: 基因杂合改善酶的性质

齐向辉 罗兆飞 吴杰群 孟晓蕾 唐悦 韦宇拓 黄日波 \*

( 广西大学广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 南宁 530005; 南宁中诺生物工程有限公司, 南宁 530005.

\* 联系人, E-mail: priboh@gxu.edu.cn)

**摘要** 1,3-丙二醇是一种重要的化工原料, 越来越受到广泛的关注. 以弗氏柠檬酸菌和克雷伯氏菌的总 DNA 以及宏基因组为模板, 克隆并表达了 3 个不同来源的甘油脱水酶基因, 前两者均有活力, 而后者则没有活力. 为了改造甘油脱水酶使其更有利于工业化生产, 通过同源建模(homology modeling)构建了这 3 个甘油脱水酶的三维结构, 并利用一些生物信息学软件对这 3 个甘油脱水酶进行亚基之间的杂合改组(gene swapping)的理性设计, 根据设计结果对这 3 种不同来源的甘油脱水酶的大、中小亚基基因分别进行了克隆. 通过基因交换的方法对甘油脱水酶大、中小亚基进行了杂合, 得到 6 种异源亚基杂合酶. 部分杂合酶的酸碱稳定性、热稳定性及  $V_{\max}$  得到了明显的改善, 同时杂合改组使本没有活力的来源于宏基因组的甘油脱水酶具有了活力而且杂合酶的热稳定性也得到了显著提高. 根据构建的三维结构分析了结构差异对酶学性质的影响.

**关键词** 甘油脱水酶 宏基因组 基因置换 理性设计 杂合酶

1,3-丙二醇(1,3-propanediol, 1,3-PD)是一种重要的化工原料, 不仅是良好的溶剂、抗冻剂、保护剂, 而且还是合成许多缩聚物的单体, 以生物法制取 1,3-PD 具有化学合成技术不可比拟的优点, 因此采用生物法制取 1,3-PD 的开发与研究在国际上越来越受到广泛关注 [1-3]. 控制甘油转化为 1,3-PD 的限速酶甘油脱水酶(GDHt, EC 4.2.1.30)是由 3 个亚基组成的同源二聚体, 大亚基( $\alpha$ )、中亚基( $\beta$ )以及小亚基( $\gamma$ )分别由 3 个基因编码. GDHt 在 CoB<sub>12</sub> 存在下将甘油转化为中间产物 3-羟基丙醛(3-HPA); 在 NADH 存在下, 1,3-丙二醇氧化还原酶(PDOR)再将 3-HPA 转化成终产物 1,3-PD, 同时将 NADH 转化为 NAD<sup>+</sup>. 弗氏柠檬酸菌(*Citrobacter freundii*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、巴氏梭菌(*Clostridium pasteurianum*)以及乳酸菌属的一些菌中均含有此基因 [4-6], 而大肠杆菌在代谢过程中不能产生 1,3-PD [7], 并不含有此基因.

1,3-PD 的发酵生产周期比较长, 产物 3-羟基丙醛以及生成的酸类会造成胞内 pH 的降低, 从而影响 GDHt 的活力 [8], 因此, 在工业生产中, 为了提高 1,3-PD 的产量和生产效率, 改造 GDHt, 以得到稳定性及酶学性质得到改善的突变酶具有非常重要的意义. 甘油脱水酶需要 CoB<sub>12</sub> 作为辅酶才具有活力, 并且其是由 3 个亚基组成的同源二聚体(共 6 个亚基), 而且还存在一个复杂的失活和激活机制, 也正是这些甘油脱水酶的复杂性, 使得从 20 世纪 90 年代中期

克隆第一个甘油脱水酶基因以来 [9,10], 一直没有关于此酶分子理性设计的报道. 在以前的研究中我们已经克隆了弗氏柠檬酸菌的 GDHt 基因 *dhaBCE*, 并在 *E. coli* 中高效表达 [11]. 在此基础上, 为了方便 GDHt 的纯化, 重新设计引物并克隆表达了弗氏柠檬酸菌及克雷伯氏菌的 GDHt 基因. 此外, 从甘油富集菌的宏基因组中克隆了一个 GDHt 基因, 但表达后并没有活力, 以上基因材料为 GDHt 的杂合改组(gene swapping)提供了条件. 克雷伯氏菌的 GDHt 的三维结构显示, 其活性中心的氨基酸残基均位于大亚基部分, 推测 GDHt 的大亚基对 GDHt 非常重要. 为了研究其对酶学性质的影响以及杂合改组 GDHt, 首先通过生物信息学软件, 并结合同源建模(homology modeling)的三维建模结构对 3 种不同来源的甘油脱水酶进行亚基之间的杂合重组的理性设计, 预测其能量的变化情况, 根据预测的能量结果来指导实验, 通过基因置换的方法对甘油脱水酶大、中小亚基进行异源亚基之间的杂合改组, 期望能获得具有活力以及性质得到改善的杂合 GDHt.

## 1 材料与方法

( ) 菌株、质粒和培养基. 弗氏柠檬酸菌(*C. freundii*)购自中国普通微生物菌种保藏中心(CGMCC), 菌株编号: AS1.1732; 克雷伯氏菌(*K. pneumoniae*)购自中国工业微生物菌种保藏中心(CCICC), 菌株编号:

10018; *E. coli* JM109 购自 Promega 公司; 质粒 pSE380 购自 Invitrogen 公司; pMD18-T 购自 TaKaRa 公司. 弗氏柠檬酸菌培养基参照文献[11]; 克雷伯氏菌培养基: 1%牛肉膏, 1%蛋白胨, 1%葡萄糖, 0.5% NaCl, pH 7.0. 甘油富集菌培养基参照文献[12].

( ) 菌株培养及基因组提取. 弗氏柠檬酸菌及克雷伯氏菌总 DNA 的提取参照文献[11]; 甘油菌的富集培养及宏基因组的提取参照文献[12,13]进行.

( ) 甘油脱水酶全长基因及其大、中小亚基基因的克隆. 根据 GenBank 中相关的弗氏柠檬酸菌 *dhaBCE* 及克雷伯氏菌 *gldABC* 基因序列, 使用 Vector NTI 设计以下系列引物(下画线处为酶切位点, 加粗碱基为 6 个组氨酸的编码基因): *dhaBCE* 全长引物 Primer1 (5'-TGCTCATGATTCACCACCATCACCA-TCATATGGGAAGATCAAAACGATT-3')和 Primer2 (5'-AAGAAGCTTTACTGGCTGCCTTTACG-3'); *dhaB* 引物 Primer1 和 Primer3 (5'-ATAGAGCTCCCGCCT-TATTCAATCGAG-3'); *dhaCE* 引物 Primer4 (5'-AAA-GAGCTCGTGGAAATGCACAACCTGAA-3')和 Primer2; *gldABC* 全长引物 Primer5 (5'-TGCTCATGATTCAC-CACCATCACCATCATATGAAAAGATCAAAACG-ATT-3')和 Primer6 (5'-CGCAAGCTTTTAGCTTCCT-TTACGCA-3'); *gldA* 引物 Primer5 和 Primer7 (5'-A-AAGAGCTCCCGCCTTATTCAATGGT-3'); *gldBC* 引物 primer8 (5'-ATAGAGCTCGTGCAACAGACAACCCA-A-3')和 Primer6.

宏基因组的 GDHt 的全长基因 *udhaBCE*, 大亚基基因 *udhaB* 及中小亚基基因 *udhaCE* 分别用弗氏柠檬酸菌 GDHt 的各引物进行扩增. 在 Primer1 及 Primer5 中引入 *Pag* (*Nco* 同尾酶)酶切位点及 6 个组氨酸的编码基因, 为了方便验证还引入了 *Nde* 酶切位点;

在 Primer2 和 Primer6 中引入了 *Hind* 酶切位点. 为了方便编码大亚基基因的交换融合连接, 在 Primer3, Primer4, Primer7 和 Primer8 中引入了 *Sac* 位点. 分别以弗氏柠檬酸菌和克雷伯氏菌的总 DNA 以及宏基因组 DNA 为模板, 使用以上全长基因引物扩增全长 GDHt 基因; 而大、中小亚基基因分别使用已构建好的重组质粒为模板进行 PCR 扩增. PCR 产物连接于 pMD18-T 上进行测序. 用 *Dpn* 酶对甲基化模板进行消化并用胶回收试剂盒进行回收, 以消除重组质粒模板对后续实验的背景影响.

( ) 序列分析及同源建模. 野生及杂合型 GDHt 的基因测序由 TaKaRa 公司完成. 核苷酸序列及其氨基酸序列利用 Vector NTI 及 NCBI BLAST 和 DIALIGN (<http://www.genomatix.de/cgi-bin/dialign/dialign.pl>)在线工具进行分析, 并通过 NCBI 软件 sequin 向 GenBank 递交序列. 根据所得序列使用 SWISS-MODEL 服务器 (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>)以及 Swiss-PdbViewer 软件 [14], 以 PDB 数据库中的克雷伯氏菌 GDHt 的三维结构 (PDB: 1iwp) 为同源建模模板, 对我们已克隆的 3 种不同来源的 GDHt 进行同源建模, 并对通过 Vector NTI 获得的大亚基与其他中小亚基的电子杂合酶进行同源建模, 获得野生酶及电子杂合酶的三维结构信息, 然后通过 Swiss-Pdb Viewer 软件的 GROMOS96 模块对获得的野生酶及电子杂合酶进行能量的计算. 再根据理性设计的能量预测结果(能量降低)进行实验操作. 最后, 根据预测的三维结构信息通过软件分析结构上的差异对酶学性质的影响. 三维结构的比对通过 DALI 服务器 (<http://www.ebi.ac.uk/dali/Interactive.html>)进行.

( ) GDHt 大亚基基因之间的交换及载体的构建. 根据 SWISS-MODEL 及相关软件对 GDHt 的理

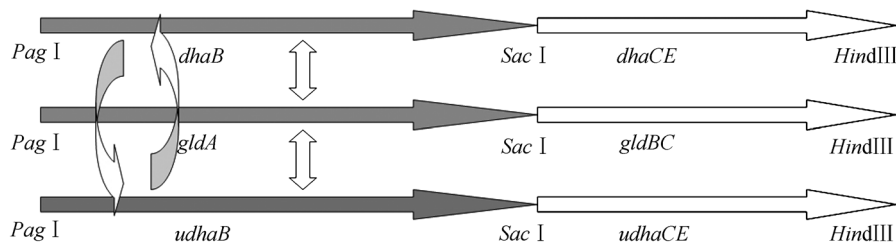


图 1 甘油脱水酶的杂合改组示意图

来源于弗氏柠檬酸菌、克雷伯氏菌及宏基因组的重组 GDHt 分别命名为 GDHtCF, GDHtKP 和 GDHtUB; 弗氏柠檬酸菌的 GDHt 大亚基与克雷伯氏菌以及宏基因组 GDHt 中小亚基基因的杂合酶分别命名为 GDHtCK 和 GDHtCU; 克雷伯氏菌 GDHt 大亚基与弗氏柠檬酸菌以及宏基因组 GDHt 中小亚基基因的杂合酶分别命名为 GDHtKC 和 GDHtKU; 宏基因组 GDHt 大亚基与弗氏柠檬酸菌和克雷伯氏菌 GDHt 中小亚基基因的杂合酶分别命名为 GDHtUC 和 GDHtUK

性设计能量计算结果, 按图 1 所示方法对 GDHt 的大亚基基因进行交换与中小亚基基因融合形成新的杂合体. 大亚基基因与中小亚基基因通过 *Sac* 连接构建杂合基因, 并连接与表达载体 pSE380.

( ) 野生及杂合型甘油脱水酶基因的表达. 野生及杂合型 GDHt 的诱导表达及 SDS-PAGE 凝胶电泳、粗酶的制备和活力测定均参照文献[11]进行, 细胞用超声波破碎.

( ) 野生及杂合型甘油脱水酶的纯化及酶学和动力学特征测定. 按照常规方法进行镍柱亲和层析纯化, 再通过Sephacryl S-300 进行了凝胶过滤层析. 镍柱先用含有 5 mmol/L咪唑的缓冲液A (100 mmol/L磷酸钾、150 mmol/L KCl, pH 8.0)平衡, 上样后用含 50 mmol/L咪唑的缓冲液A洗杂蛋白, 再用含 200 mmol/L咪唑的缓冲液A洗脱目的蛋白并收集; 随后再过Sephacryl S-300 凝胶柱, 以除去未结合的亚基及脱盐, 用 100 mmol/L pH 8.0 的磷酸钾缓冲液洗脱收集. 蛋白质浓度采用Bradford法进行测定, 以牛血清蛋白作为标准. 在不同的反应温度及不同pH的磷酸钾缓冲液中测定温度和酸碱度对酶的影响. 酶的稳定性测定: 将适量纯酶液在pH 8.0的磷酸钾缓冲液中分别置于 45 和 50 保温或于pH 6.0及pH 10.0的磷酸钾缓冲液 37 保温, 每隔 30 min取样, 立即放置于冰上, 并按上述方法进行残存活力测定 [15]. 因为 GDHt对底物甘油的自杀失活原因, 采用 1,2-丙二醇 (1,2-PD) 测定 GDHt 的活力及比活力, 并利用 Lineweaver-Burk做图法获得野生及具有活力的杂合型甘油脱水酶的 $K_m$ 和 $V_{max}$ 等.

## 2 结果

### 2.1 GDHt 及其大、中小亚基基因的克隆、杂合及表达载体的构建

通过 PCR 方法, 用以上引物系列分别从弗氏柠檬酸菌和克雷伯氏菌的总 DNA 以及宏基因组中扩增出约 2.7 kb 的基因片段, 与预期结果相符. 纯化的 PCR 产物连接于 pMD18-T, 经测序正确后, 再连接于表达载体 pSE380, 转化到感受态细胞大肠杆菌 JM109 中, 通过菌体电泳、酶切验证及活力测定来筛

选重组子. 弗氏柠檬酸菌、克雷伯氏菌和来源于宏基因组的 GDHt 序列在 GenBank 中的接受编号分别为 DQ152921, DQ191044 和 DQ191045. 验证正确的重组子质粒再作为 PCR 的模板以扩增获得杂合酶大、中小亚基基因. Swiss-Pdb Viewer 软件的 GROMOS96 模块对 3 种甘油脱水酶以及通过大亚基杂合获得的甘油脱水酶的三维结构进行能量预测, 结果见表 1. 能量预测结果发现, 通过杂合重组后, 相对于 GDHtKP, 它们的总能量均有较明显的下降, 其中 GDHtKC 和 GDHtKU 下降最明显. 为了进一步研究杂合重组后 GDHt 酶学性质的变化, 将这 3 种来源的 GDHt 基因的大亚基与其他中小亚基进行异种亚基杂合重组, 并连接于表达载体 pSE380, 转化到大肠杆菌 JM109 中, 验证正确的重组子再经送样测序显示序列正确无误.

### 2.2 外源基因表达及重组酶的纯化

重组菌株用 IPTG 诱导, 粗酶液 SDS-PAGE 蛋白质电泳结果表明, 重组菌株均具有非常明显的 62, 22 和 16 kD 左右的特征蛋白条带出现, 重组蛋白的分子量大小与理论值相符, 在大量表达的菌体经超声波破碎后收集的沉淀中并未检测到重组的 GDHt, 说明表达蛋白是以可溶性形式存在的. 带有 6 个 His 标签的野生及杂合型 GDHt 经镍柱亲和层析和 Sephacryl S-300 进一步纯化及脱盐处理后, 可明显见到纯净的 3 条蛋白质条带出现, 对应于 GDHt 的 3 个亚基. 来源于宏基因组的 GDHt 的 SDS-PAGE 见图 2, 其他图略.

### 2.3 重组 GDHt 的序列分析

克隆的弗氏柠檬酸菌和克雷伯氏菌的 GDHt 以及从宏基因组中克隆的 GDHt 的核苷酸和氨基酸序列与 GenBank 中同类酶同源性比较结果见表 2, 它们的核苷酸相似性均在 70%以上; 氨基酸相似性均在 90%以上. 两种不同属的 GDHt 以及宏基因组的 GDHt 同源性比较高; BLAST 及 Align 分析显示来自宏基因组的 GDHt 与 GenBank 中弗氏柠檬酸菌的 GDHt (U09771)同源性最高, 可以确定这个来源于宏基因组的基因为 GDHt 基因. 3 种 GDHt 的活性中心位点高度保守.

表 1 野生和杂合型甘油脱水酶的能量预测信息<sup>a)</sup>

类型	GDHtCF	GDHtKP	GDHtCK	GDHtKC	GDHtKU	GDHtCU	GDHtUC	GDHtUK
总能量	-98074.0	-81056.0	-97571.8	-101130.5	-100874.8	-97810.0	-98550.5	-98048.2

a) 用 Swiss-Pdb Viewer 软件中的 GROMOS96 模块进行能量的最小化计算

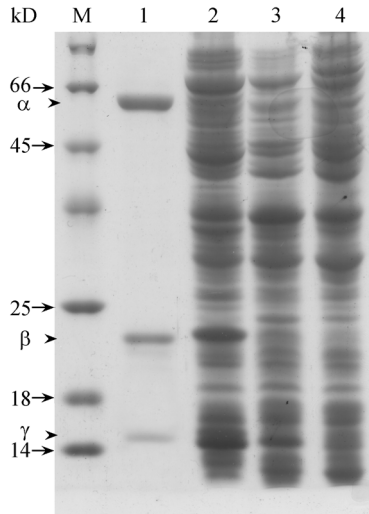


图2 从宏基因组中获得的甘油脱水酶的 SDS-PAGE 分析 M, 蛋白质分子量标准; 1, 经 Sephacral S-300 和镍柱纯化后的 GDHtUB; 2, 经 IPTG 诱导表达的 GDHtUB 的粗酶液; 3, 未经 IPTG 诱导表达的 GDHtUB 的粗酶液; 4, 仅有 pSE380 的 JM109 空白对照

### 2.4 野生及杂合 GDHt 的酶学性质

用 Sephacral S-300 进一步纯化及脱盐后的纯酶液进行重组酶比活力及酶的动力学性质的测定(表 3, 图 3). 野生及杂合型 GDHt 的  $K_m$  值均基本一致, 处在同一水平. 在不同的温度及不同 pH 缓冲液中分别测定温度和酸碱度对 GDHt 的影响, 结果显示, 野生及杂合型 GDHt 的最适温度和最适 pH 均没有变化, 分别为 45 和 pH 8.5; 杂合酶 GDHtKU 使来源于宏

基因组的 GDHt 具有了活力, 虽然比活力还不到 GDHtCF 和 GDHtKP 的一半, 但其在 45 , pH 8.0 条件下的半衰期提高到了 5.0 h, 是 GDHtKP 的 5 倍; 另外, 50 , pH 8.0 条件下的稳定性得到了明显改善, 在此条件下保温 20 min 后相对活力尚存 50%以上, 40 min 后尚存 40%, 但野生及其他杂合型 GDHt 在此条件下 20 min 相对活力就降为了 0. 杂合酶 GDHtCK 的比活力没有变化, 其  $V_{max}$  有一定幅度的提高, 对甘油的  $V_{max}$  约是 GDHtKP 的 2 倍; 而杂合酶 GDHtKC 活力有部分降低, 这两个杂合酶对酸碱的耐受性均得到了明显提高, 约为 GDHtCF 和 GDHtKP 的 3~4 倍, pH 的适应范围明显变宽, 而在 45 , pH 8.0 条件下的稳定性相对于 GDHCF 并没得到改善, 但相对于 GDHtKP 均提高了约 3 倍.

### 2.5 野生及杂合 GDHt 的三维结构分析

以 PDB 数据库中 GDHt (1iwp)的三维结构为模板, 对野生和杂合型甘油脱水酶进行同源建模. 三维建模显示, GDHt 均是由  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$  形式的同源二聚体(GDHtKP 的三维结构见图 4(a), 其他三维结构图略)组成;  $\alpha$  亚基含有 25 个  $\alpha$  螺旋和 14 个  $\beta$  折叠,  $\beta$  亚基含有 5 个  $\alpha$  螺旋和 7 个  $\beta$  折叠,  $\gamma$  亚基 7 个  $\alpha$  螺旋和 2 个  $\beta$  折叠.  $\alpha$  亚基含有一个由 8 个  $\beta$  折叠组成的 TIM 桶状结构(活性中心), 底物 1,2-PD,  $CoB_{12}$  以及  $K^+$ 均结合于这个桶状结构内.  $CoB_{12}$  结合于  $\alpha$  和  $\beta$  亚基的界面处, 并且将活性中心口袋状结构覆盖. 同源二聚体中,

表2 GenBank 中甘油脱水酶的多重比对分析<sup>a)</sup>

	<i>K. pneumoniae</i> (DQ191044)	Ub (DQ191045)	<i>C. freundii</i> (U09771)	<i>K. pneumoniae</i> (U60992)	Ub (AY205332)
<i>C. freundii</i> (DQ152921)	77% 91%	87% 96%	85% 96%	77% 91%	84% 97%
<i>K. pneumoniae</i> (DQ191044)		79% 91%	78% 91%	99% 99%	78% 91%
Ub (DQ191045)			88% 97%	79% 92%	86% 96%
<i>C. freundii</i> (U09771)				78% 91%	86% 97%
<i>K. pneumoniae</i> (U60992)					79% 91%

a) 每组上面数据为核苷酸相似一致性分析, 下面数据为氨基酸的相似一致性分析; 最大值用下画线标出

表3 野生和杂合型甘油脱水酶的酶学及动力学性质<sup>a)</sup>

类型	比活力/ $U \cdot mg^{-1}$	$K_m/mmole \cdot L^{-1}$		$V_{max}/U \cdot mg^{-1}$		半衰期/h		
		1,2-PD	甘油	1,2-PD	甘油	pH 6.0	pH 10.0	45
GDHtCF	91.9	0.25	0.59	73.5	142.9	1.0	1.0	3.0
GDHtKP	85.8	0.24	0.60	61.5	130.1	1.0	1.0	1.0
GDHtCK	90.3	0.22	0.59	89.9	260.8	3.0	4.0	3.0
GDHtKC	56.9	0.23	0.57	71.0	102.6	4.0	3.0	3.0
GDHtKU	37.2	0.35	0.42	30.6	39.7	1.0	1.0	5.0

a) 所有数值均为3次实验数据的平均值

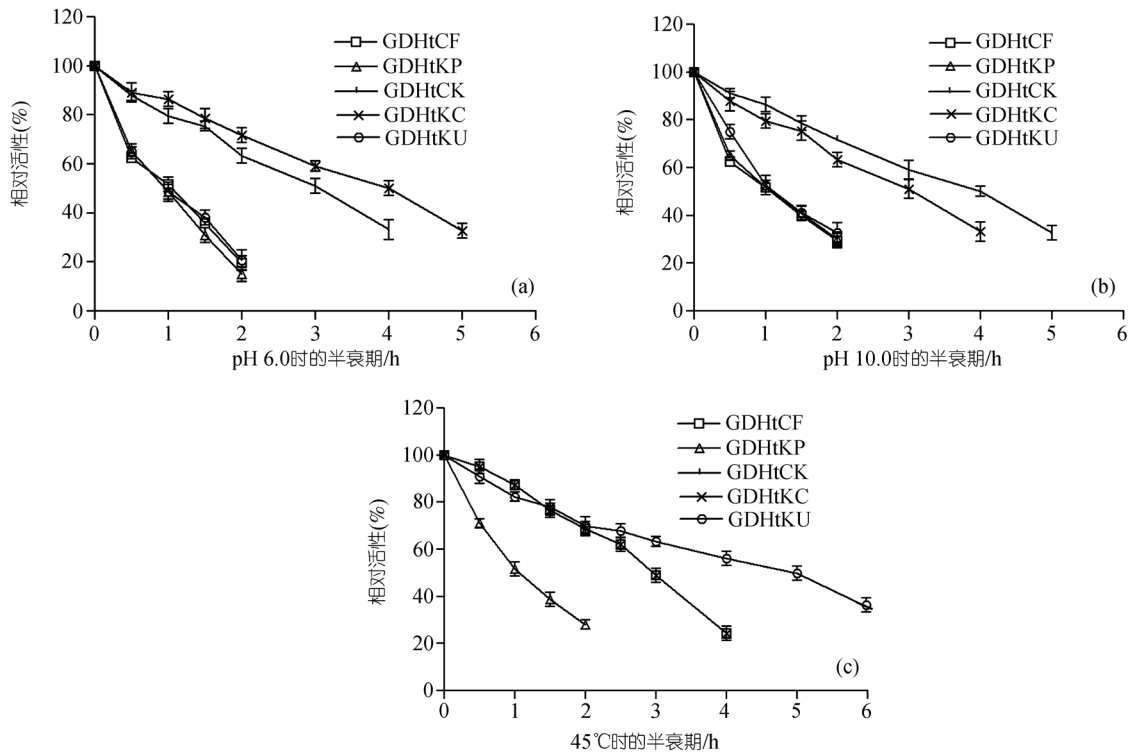


图 3 野生型和杂合型甘油脱水酶的稳定性测定

(a) pH 6.0, 37 条件下的半衰期; (b) pH 10.0, 37 条件下的半衰期; (c) pH 8.0, 45 条件下的半衰期

仅仅  $\alpha$  亚基发生交叉. 经 Swiss-Pdb Viewer 和 DALI 分析计算, 所构建的三维结构与模板之间的根均方差(RMSD)均在 0~0.01 nm. 一级结构氨基酸序列上的差异造成了高级结构上的微妙的差异, 这些差异很有可能是造成酶的性质差异的原因. 通过软件 Swiss-Pdb Viewer 分析了能量上的变化, 三维结构分析显示杂合酶的总能量均要比野生型 GDHtKP 的低, 其中具有活力的杂合酶 GDHtCK, GDHtKC 和 GDHtKU 总能量下降尤其明显(表 1).

利用获得的三维结构模型, 通过 Swiss-Pdb Viewer 预测了野生和杂合酶的可能的活性中心, 发现活性中心均位于大亚基, 具有活力的 GDHtCF, GDHtKP, GDHtCK, GDHtKC 和 GDHtKU 活性中心由 12 个保守氨基酸残基组成, 分别为  $\alpha$ -Gln142,  $\alpha$ -His144,  $\alpha$ -Glu171,  $\alpha$ -Glu222,  $\alpha$ -Thr223,  $\alpha$ -Gln297,  $\alpha$ -Val301,  $\alpha$ -Thr302,  $\alpha$ -Asp336,  $\alpha$ -Gln337,  $\alpha$ -Ser363 和  $\alpha$ -Phe375, 其中直接与底物结合的氨基酸残基有 6 个, 分别为  $\alpha$ -His144,  $\alpha$ -Glu171,  $\alpha$ -Glu222,  $\alpha$ -Gln297,  $\alpha$ -Asp336 和  $\alpha$ -Ser363, 这些氨基酸残基高度保守(图 4(b), 以 GDHtKP 示意, 其他图略). 具有活力的杂合

酶的底物与活性中心氨基酸残基之间形成氢键的数目和距离也均有不同程度的变化(图 5), 相对于野生酶 GDHtKP 而言, 变化范围在 0~0.026 nm 之间, 并且它们的底物与氨基酸残基  $\alpha$ -297Q 之间形成了 2 个分子内氢键, 而在野生酶中仅有 1 个; 而杂合酶 GDHtKU 与野生酶 GDHtKP 相比, 底物与活性中心的 6 个氨基酸残基之间形成的 7 个氢键中有 5 个的距离变小了(0~0.014 nm). 以上变化很有可能使杂合酶 GDHtKU 的活性中心结构更加紧凑, 增加了酶的稳定性, 但这个紧凑的空间结构, 可能并不利于底物的结合, 从而使该杂合酶的活力和  $V_{max}$  值有大幅度下降.

而没有活力的 GDHtUB 的活性中心与底物直接接触的 6 个氨基酸残基中的  $\alpha$ -Asp336 位(位于大亚基)发生了变化, 变为了  $\alpha$ -Gly336, 从而使与其大亚基重组后的杂合酶的活性中心均发生了变化, 并且活性位点  $\alpha$ -336 处于 8 个  $\beta$  折叠组成的活性中心的一个转角部位(图 4(c)), 它的改变很大程度上会导致与其相关的其他二级结构的位移, 引起活性中心构象的直接变化; 并且此位点由  $\alpha$ -Asp336 改变为  $\alpha$ -Gly336 后不再与底物之间形成氢键(图 5(c)). 这些没有活力的

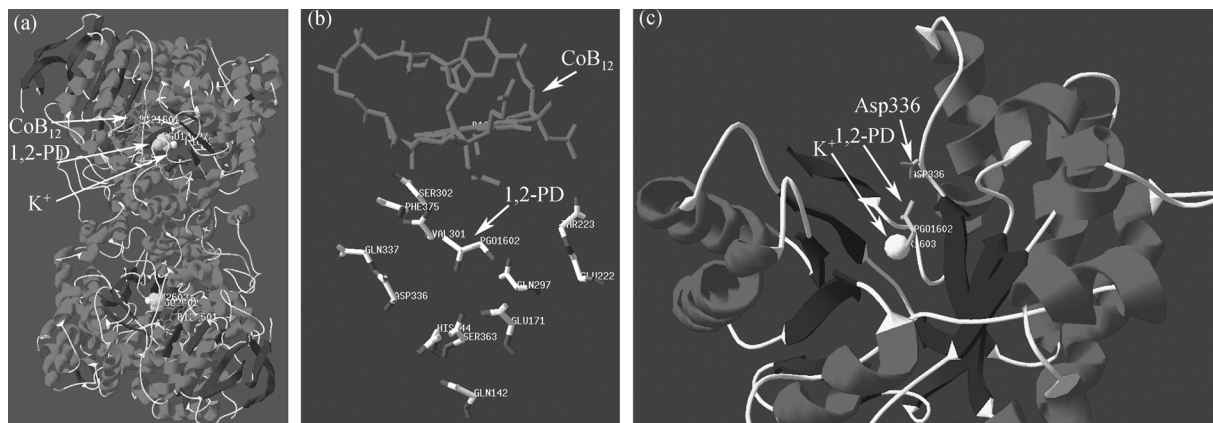


图4 克雷伯氏菌甘油脱水酶的同源建模结构

(a) 整体结构示意图; (b) 预测的活性中心与底物结合的氨基酸残基; (c)  $\alpha$ -336 空间位置示意图

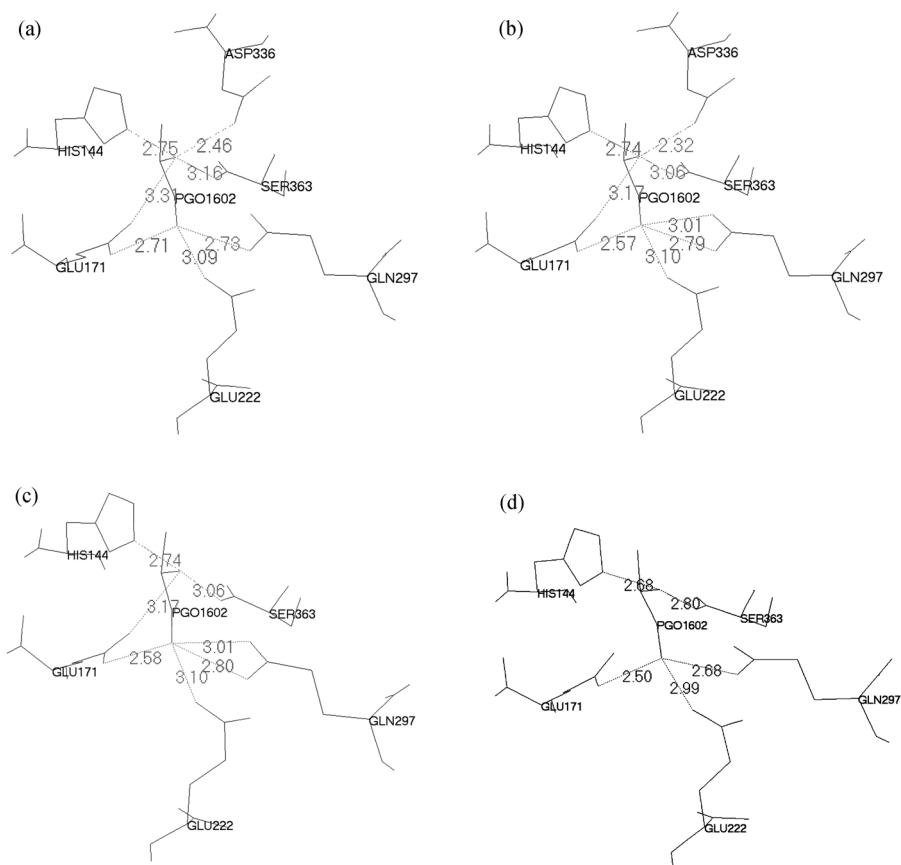


图5 GDHtKP(a), GDHtKU(b), GDHtUB(c)和 GDHtUK(D)的底物 1,2-PD 与氨基酸残基结合的氢键结构示意图

杂合酶(GDHtCU, GDHtUC 和 GDHtUK)的三维结构显示, 活性中心氨基酸残基与底物之间形成氢键的距离相对于野生酶 GDHtKP 均有一定程度的变化(图5), 其中距离变化最大的达到了 0.036 nm(图5(d),  $\alpha$ -Asp336 或  $\alpha$ -Gly336 位点除外), 并且杂合酶

GDHtUK 底物与  $\alpha$ -Glu171 之间的氢键消失了, 这些均会引起活性中心构象的较大变化. 推测活性中心氨基酸残基 336 位点的变化很有可能是造成那些具有此亚基的杂合酶(GDHtUC 和 GDHtUK)没有活力的根本原因, 但也并不排除其他结构空间上的微小变

化直接或间接影响到 GDHt 的活力的有无。

### 3 讨论

环境中可培养的微生物, 一般情况下还不到微生物总数的 1%, 多达 99% 以上的微生物采用现有的手段是无法分离培养的, 这些被称为未培养或不可培养的微生物是一个极其具有利用潜力的类群, 它所拥有的巨大基因组(宏基因组)资源将为人们提供几乎是无穷无尽的新基因 [16]。从宏基因组中克隆已知或未知(建库或通过保守区及反向 PCR)基因, 是一种有效而便捷的获得基因的方法。有报道已从多种微生物中克隆并表达了 GDHt 基因, 然而从宏基因组中克隆此基因的报道比较少见, 本研究从宏基因组中克隆了一个 GDHt 基因, 因为扩增所用引物的原因, 其同源性比较高, 但为一些基因的获得提供了一条新的途径。

基因交换是属于理性设计的范畴, 根据酶的三维结构信息, 再对酶分子从基因水平进行改性, 它克服了酶的体外定向进化(directed evolution of enzyme in vitro 或 irrational design, 如 error-prone PCR, DNA shuffling) 技术的筛选工作量大及盲目性等缺点, 具有针对性; 它利用现有酶的序列和结构方面的知识结合计算机理性设计, 把来自不同种属的酶分子的结构域(亚基)进行重组形成一个新的杂合酶; 或者将本身没有活力的酶分子进行模块重组, 以获得具有活力或者具有新特性的杂合酶, 是家族改组(family shuffling)的一个缩影 [17]。杂合改组不但可以得到性质改善的酶, 而且还可以据此推测结构和功能上的一些关系, Singh 等人 [18] 将不同属的  $\beta$ -葡萄糖苷酶进行了杂合, 从而使杂合酶具有较宽的 pH 适应范围和较高的稳定性, 并推测此酶的 C 端在酶的性质中扮演着重要的角色。

同源建模的可行性及可靠性已得到有力的证实 [14,19], 本研究中所使用的同源建模的模板与克隆的野生及杂合型 GDHt 相似性均在 90% 以上, 完全可以采用此种方法进行三维结构的同源建模。野生和杂合酶与模板 1iwp 的 1754 个  $C_{\alpha}$  原子的 RMSD (root-mean-square deviation) 均在 0.01 nm 之内, 说明通过同源建模方法构建的三维模型的质量比较好。甘油脱水酶的大亚基含有活性中心, 中小亚基可能在与激活因子的结合中起作用 [20,21], 建模显示, 活性中心均位于大亚基, 大亚基在酶的活性中扮演着极其重要的角色。结合所得到的三维结构, 利用 Swiss-Pdb Viewer 软件不但可以通过能量预测进行蛋白质的理

性设计, 还可利用其能量最小化的计算机辅助设计, 通过定点突变来改造酶。异种亚基杂合 GDHt 仍然有可能得到正确加工, 而使本没有活力的 GDHt 具有活力或催化性能得到改变。由 3 种不同来源的 GDHt 进行杂合改组构建的 6 种杂合酶, 仅有部分具有活力, 没有活力的杂合酶均是由来源于宏基因组的 GDHt (该酶没有活力) 的亚基进行的杂合体。同源建模显示, 来源于宏基因组的不具有活力的 GDHt 的活性中心的氨基酸残基  $\alpha$ -Asp336 变成了  $\alpha$ -Gly336, 也即由一个酸性的荷电氨基酸 Asp 变为了侧链仅有一个氢原子的具有特殊结构的 Gly, 是否是由于此原因或三维结构上的微妙变化直接或间接造成那些具有此位点的杂合酶没有活力有待进一步的研究。值得注意的是, GDHtUB (来自于宏基因组, 且没有活力) 的中小亚基与克雷伯氏菌的大亚基重组后的杂合酶 GDHtKU 却具有活力, 并且其热稳定性得到了明显改善; 弗氏柠檬酸菌及克雷伯氏菌之间的杂合均具有活力, 它们在酸碱条件下的稳定性均有不同程度的改善, 并且 GDHtCK 的  $V_{max}$  也得到了提高。有研究认为, 氢键尤其是分子内氢键在稳定蛋白质的结构中起着极其重要的作用, 是影响蛋白质稳定性的主要原因 [22], 杂合重组使活性中心的几个氨基酸残基与底物之间的分子内氢键发生了比较明显的变化(0~0.036 nm)。并且从以上结果来看, 虽然 GDHt 的活性中心均位于大亚基, 但稳定性的改善并不是单独由大亚基造成的, 而可能是由大亚基与其他亚基的共同作用的结果。一般来说, 酶分子总能量的降低有助于酶的稳定性的提高 [23], 三维结构分析显示具有活力的杂合酶 GDHtCK, GDHtKC 和 GDHtKU 的总能量都要比野生型 GDHtKP 的明显低, 这也可能是它们稳定性得到改善的根本原因。这些杂合酶结果的差异需要得到更准确的结晶结构, 再通过三维结构做进一步的分析研究, 当然这个研究过程也是相当复杂的。虽然, 弗氏柠檬酸菌和克雷伯氏菌甘油脱水酶国外已经作过克隆表达的报道, 但对于其酶学性质及动力学特征均没有做过系统的研究, 本实验不但研究了它们的性质, 还克隆表达了来源于宏基因组的甘油脱水酶基因, 而且利用理性设计对 3 种不同来源的甘油脱水酶通过包含有活性中心的大亚基进行杂合重组, 使杂合酶的酶学性质得到了明显改善。本研究开辟了 GDHt 的分子改性研究的新领域, 并为深入了解 GDHt 性质与结构的关系以及生物法高效生产 1,3-PD 奠定

了基础.

致谢 本工作为国家重点基础研究发展计划(批准号:2004CB719606)和国家高技术研究发展计划(批准号:2003AA001039)资助项目.

### 参 考 文 献

- 1 Raynaud C, Sarcabal P, Meynial-Salles I, et al. Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Clostridium butyricum*. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(9): 5010—5015[DOI]
- 2 Papanikolaou S, Ruiz S P, Pariset B, et al. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. J Biotechnol, 2000, 77(2-3): 191—208[DOI]
- 3 Tong I T, Liao H H, Cameron D C. 1,3-Propanediol production by *Escherichia coli* expressing genes from the *Klebsiella pneumoniae* dha regulon. Appl Environ Microbiol, 1991, 57(12): 3541—3546
- 4 Claisse O, Lonvaud F A. Primers and a specific DNA probe for detecting lactic acid bacteria producing 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol in spoiled ciders. J Food Prot, 2001, 64(6): 833—837
- 5 Macis L, Daniel R, Gottschalk G. Properties and sequence of the coenzyme B<sub>12</sub>-dependent glycerol dehydratase of *Clostridium pasteurianum*. FEMS Microbiol Lett, 1998, 164: 21—28[DOI]
- 6 Tobimatsu T, Azuma M, Matsubara H, et al. Cloning, sequencing, and high level expression of the genes encoding adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydrase of *Klebsiella pneumoniae*. J Biol Chem, 1996, 271(37): 22352—22357[DOI]
- 7 Wang W, Sun J, Hartlep M, et al. Combined use of proteomic analysis and enzyme activity assays for metabolic pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. Biotechnol Bioeng, 2003, 83(5): 525—536[DOI]
- 8 Barbirato F, Larguier A, Conte T, et al. Sensitivity to pH, product inhibition, and inhibition by NAD<sup>+</sup> of 1,3-propanediol dehydrogenase purified from *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210. Arch Microbiol, 1997, 168: 160—163[DOI]
- 9 Seyfried M, Daniel R, Gottschalk G. Cloning, sequencing, and overexpression of the genes encoding coenzyme B<sub>12</sub>-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*. J Bacteriol, 1996, 178(19): 5793—5796
- 10 Tobimatsu T, Azuma M, Matsubara H, et al. Cloning, sequencing, and high level expression of the genes encoding adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydrase of *Klebsiella pneumoniae*. J Biol Chem, 1996, 271(37): 22352—22357[DOI]
- 11 Qi X H, Zhu Q X, Huang R B, et al. Gene cloning and expression of glycerol dehydratase from *Citrobacter freundii* in *Escherichia coli*. Ind Microbiol, 2005, 35: 10—13
- 12 Knietzsch A, Bowien S, Whited G, et al. Identification and characterization of coenzyme B<sub>12</sub>-dependent glycerol dehydratase- and diol dehydratase-encoding genes from metagenomic DNA libraries derived from enrichment cultures. Appl Environ Microbiol, 2003, 69: 3048—3060[DOI]
- 13 Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(2): 316—322
- 14 Schwede T, Kopp J, Guex N, et al. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. Nucleic Acids Res, 2003, 31: 3381—3385[DOI]
- 15 Minagawa H, Shimada J, Kaneko H. Effect of mutations at Glu160 and Val198 on the thermostability of lactate oxidase. Eur J Biochem, 2003, 270: 3628—3633[DOI]
- 16 Knietzsch A, Waschowitz T, Bowien S, et al. Metagenomes of complex microbial consortia derived from different soils as sources for novel genes conferring formation of carbonyls from short-chain polyols on *Escherichia coli*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2003, 5(1): 46—56[DOI]
- 17 张红缨, 孔祥铎, 张今. 蛋白质工程的新策略——酶的体外定向进化. 科学通报, 1999, 44(11): 1122—1125
- 18 Singh A, Hayashi K. Construction of chimeric beta-glucosidases with improved enzymatic properties. J Biol Chem, 1995, 270: 21928—31933
- 19 崔岩, 凌伦奖, 陈润生, 等. HIV-1 Tat 蛋白定点突变的分子动力学模拟. 科学通报, 1999, 44(2): 177—180
- 20 Tobimatsu T, Kajiura H, Toraya T. Specificities of reactivating factors for adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase. Arch Microbiol, 2000, 174(1-2): 81—88[DOI]
- 21 Liao D I, Dotson G, Turner I J, et al. Crystal structure of substrate free form of glycerol dehydratase. J Inorg Biochem, 2003, 93(1-2): 84—91[DOI]
- 22 王大成. 蛋白质工程. 北京: 化学工业出版社, 2002. 149—165
- 23 Dai L S, Ji C N, Wang J, et al. Modeling study of the thermostable alkaline phosphatase (FD-TAP). Chin J Biochem Mol Biol, 2001, 17(3): 365—371

(2006-07-14 收稿, 2006-09-18 接受)