

喹啉加氧酶中氧气扩散的通道分析

周超, 石婷, 赵一雷, 王晓雷

(上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240)

摘要 通过生物信息学分析、量化计算优化、CAVER 和 MDpocket 预测、随机加速分子动力学及伞状抽样动力学模拟等方法, 对喹啉加氧酶(HOD)中的氧气扩散途径进行了计算预测. 结果表明, 氧气在 HOD 中的反应位点包埋在蛋白内部, 而 HOD 中有数条可能的通道供氧气进出, 其中长度最短的通道具有最高的优先级, 不仅在随机加速动力学模拟中具有最高的氧气逸出概率, 而且伞状抽样方法计算得到的自由能也最低. 此通道的内端位于底物 Re 面的氧气结合位点, 较好地解释了 HOD 的相关实验数据.

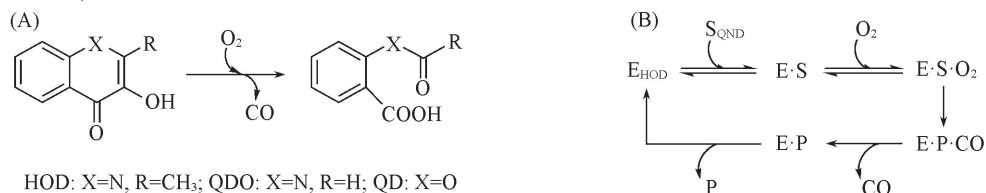
关键词 喹啉加氧酶; 氧气扩散; 随机加速分子动力学; 伞状抽样

中图分类号 O641

文献标志码 A

微生物参与的生物降解是环境中污染物自然分解的重要组成部分, 而很多有机污染物在微生物中的代谢都需要氧气的参与. 喹啉类化合物被广泛应用于医药、橡胶及染料等, 具有易挥发、易溶于水及不易降解的特性, 在土壤和水源中广泛分布^[1,2], 并且喹啉类化合物及其衍生物大多为致癌物或致畸物^[3,4]. 20 世纪 90 年代, 人们发现了几种可以专一代谢喹啉类化合物的微生物, 而喹啉加氧酶(1-*H*-3-Hydroxy-4-oxoquinolindine 2,4-dioxygenases, HOD)在降解喹啉类化合物的代谢途径中发挥了关键的氧化裂解开环的作用, 而且实验发现 HOD 对天然底物外的其它喹啉类似物也有一定的催化能力^[5,6]. 因此 HOD 在污染物处理方面具有潜在的应用前景.

HOD 虽然发挥着双加氧酶的功能, 但是却属于 α/β 水解酶折叠超家族, 其依赖由 His251 和 Asp126 所构成的催化二联体来帮助完成催化^[7-9]. HOD 的一个特殊之处是能够不需要辅因子的参与就可以活化氧气完成氧化反应, 是一种非辅酶依赖性加氧酶, 目前已经发现了 9 种此类酶^[10,11] [Scheme 1(A)]. 此外, 研究发现 HOD 遵循有序反应的催化机制, 如 Scheme 1(B)所示, 底物 S(1-*H*-3-Hydroxy-4-oxoquinolindine, QND)首先与酶(E)形成复合物, 然后再与氧气结合, 最终产生三元复合物, 随后 CO 和产物 P(*N*-乙酰基邻氨基苯甲酸)相继被释放出来^[12]. 通常, 氧气以自由扩散的方式进入酶蛋白, 但一些研究发现氧气会沿着特定通道进入酶的活性中心^[13], 并且这些通道可以在时空上对氧气的运动进行调节^[14-17], 这也为解释一些加氧酶的催化反应具有区域和立体异构选择性提供了新的视角^[18,19]. 由于氧气的扩散需要一些柔性的疏水氨基酸所构成的网络来介导^[15,18,20], 而这样的通道在静态晶体结构中常观察不到, 因此在实验上会利用与氧气具有相似结合特性的氙气或其它离子来替代氧气进行结



Scheme 1 Degradation reaction catalyzed by HOD and its analogue enzymes, QDO and QD(A) and catalytic cycle of HOD(B)

收稿日期: 2017-04-01. 网络出版日期: 2017-09-22.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 21377085, 21303101)、中国博士后科学基金(批准号: 2014T70413, 2014M561463)和上海交通大学高性能计算中心资助.

联系人简介: 王晓雷, 男, 博士, 助理研究员, 主要从事生物分子结构计算和动力学研究. E-mail: thundawner@sjtu.edu.cn

晶^[21,22]. HOD 的晶体也通过氯离子代替氧气获得了与底物的共晶,而且结构显示此位点处于催化口袋的更深处,包埋在底物分子的下方(图 1),这显示氧气可能不是通过底物通道进入催化口袋的.通过氧气潜在的结合位点来推测扩散通道往往不能获得理想的结果^[23],因此通过计算预测氧气通道便成为了一个比较好的方法,常用方法包括拉伸分子动力学^[24]、伞形取样方法^[25]及隐式配体采样^[16,18]等.目前有关 HOD 的氧气扩散通道尚无实验和计算方面的研究.

为了探索 HOD 中氧气扩散的过程,本文通过量子化学计算确定氧气的结合位点,然后从软件预测、随机加速动力学模拟和伞状抽样分子动力学计算的角度发现了一些潜在的氧气扩散途径,并对氧气通过不同通道的优先度进行了计算和比较,最终预测得到最为可能的氧气通道.这为认识 HOD 催化反应的立体选择性及反应动力学提供了理论基础,对于 HOD 的酶工程改造与工业应用有一定的理论指导意义.

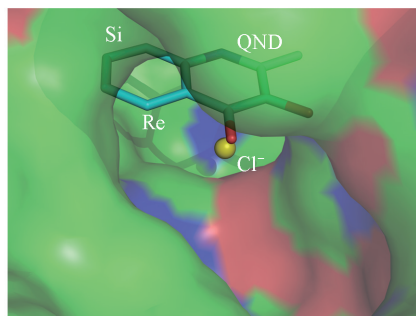


Fig.1 Location of Cl⁻ in the crystal structure of HOD

Cl⁻ is buried deeper inside the active pocket, beneath the substrate QND, which is also the putative binding site of O₂. Re face and Si face of QND are labelled according to the carbonyl group.

1 计算方法

1.1 序列比对和结构比对

自然界中有多种能够降解喹啉或类似结构化合物的酶,为了考察它们之间的共性,选取了催化功能相近的喹啉加氧酶 HOD 和 QDO (1-*H*-3-Hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase) 及黄酮醇加氧酶 (Quercetin 2,3-dioxygenase, QD) 进行生物信息学分析 [Scheme 1 (A)]. 3 种酶的序列及结构取自 RCSB PDB, 编号分别为 2WJ4, 3IBT 和 1H1I, 然后利用 Discovery Studio 3.5 软件包中 Macromolecular 模块的 Align Sequences 功能进行序列比对分析, 利用 Align and Superimpose Proteins 功能及 PyMOL 软件进行结构比对分析.

1.2 量子化学计算

目前, HOD 晶体中没有包含氧气的结构, 只有用氯离子替代氧气得到大概的位置信息. 因此为了确定氧气扩散进入 HOD 蛋白后最终反应前的结合位点, 依据晶体结构中氯离子的位置信息, 构建了量子化学计算模型进行计算. 模型的初始结构取自 RCSB PDB (ID: 2WJ4, 2WM2), 根据氯离子的位置, 在其周围的球形空间中平均分布了 26 种不同的氧气构象, 然后分别进行优化. 底物及其周围的残基 Trp36, His38, His100, Ser101, His102, Asp126, Trp160, Ser220, Gln221 和 His251 也一并包含在计算模型中, 同时为了保持模型结构在优化过程中不会发生异常变动, 每个残基都选取 1~2 个原子进行了冻结. 并采用 Gaussian 09 程序包^[26]在 M06/6-31G(*d*) 的水平上进行结构优化.

1.3 CAVER 和 MDpocket 计算

CAVER 被广泛应用于描述和预测一些静态大分子结构中的传输通道, 能够基于格点算法方便快速地发现从结构内部口袋到表面溶剂的通道. 将 HOD 的晶体结构 (PDB ID: 2WJ4) 去除其中的结晶水分子后作为 CAVER 3.0^[27] 的初始输入文件, 然后进行相应的氧气通道的计算.

MDpocket^[28] 是用于描述和搜寻静态的蛋白质结构中口袋的软件, 可以对晶体结构及分子动力学模拟轨迹中所获得的结构进行计算, 并且快速找到许多不同的口袋. 同样, 本文将去除结晶水的 HOD 晶体结构 (PDB ID: 2WJ4) 作为 MDpocket 的初始输入文件, 并进行口袋的搜寻, 然后利用 POVME 2.0^[29] 计算不同口袋的体积.

1.4 随机加速分子动力学模拟

随机加速分子动力学模拟 (RAMD) 能够极大地缩短配体沿着一定通道进出活性中心的模拟时间^[30], 并在许多体系中得到了广泛应用, 如雌激素受体^[31]、胰岛素体系^[32]及 P450 体系^[33]等. 随机加

速分子动力学模拟在模拟过程中会给配体施加一个随机方向的外力,如果在一定的时间步长内配体运动的距离未超过设定的阈值,外力就将改变方向,否则力的方向则会维持不变,不断重复这一过程直至配体离开通道。

在进行 RAMD 计算之前,先进行了底物 QND、氧气和 HOD 所构成复合物的经典分子动力学模拟。计算模型基于 HOD 的晶体结构(PDB ID: 2WJ4),选取该晶体结构中 4 条蛋白链中的 1 条作为研究对象,氧气的初始位置则根据量化计算得到的平均结构确定。带电氨基酸的状态根据 PDB2PQR 的计算来进行确认。蛋白质和底物小分子分别使用 AMBER ff03. r1 力场和 GAFF 力场,整个体系置于厚度不低于 1.00 nm 的 TIP3P 八面体水盒子中,利用 Amber12 软件^[34]进行分子动力学模拟。模拟过程包括 10000 步能量最小化,50 ps 加热及 50 ps 平衡,将最后获得的结构作为 RAMD 模拟的初始结构。在 RAMD 计算中,通过测试将力常数设为 $3.35 \text{ kJ} \cdot \text{nm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$,距离阈值设为 0.001 nm,时间步长分别设为 10, 30, 50,然后在不同的时间步长下分别进行 20 次独立重复的模拟,共模拟了 60 条轨迹。随机加速分子动力学模拟利用 NAMD 软件^[35]完成。

1.5 伞状抽样动力学模拟

为了进一步比较氧气分子进出通道能量上的差异,使用了伞状抽样分子动力学计算氧气进出不同通道自由能的变化,并使用加权直方图分析方法(WHAM)进行分析比较。在伞状抽样模拟过程中,将整条通道划分为不同的计算窗口,反应坐标设定为氧气分子的质心与底物 QND 的 C2 原子之间的距离,模拟的起点反应坐标均设定在 0.3 nm,接近氧气发生反应前的位置,终点则根据通道长度的不同设定在氧气完全脱离蛋白处,窗口之间的步长在一般情况下均设定为 0.03 nm,每个窗口的初始结构依据之前 CAVER 预测得到的结果,将氧气分子沿不同通道的中轴线摆放而得到。通常,使用 $4.18 \times 10^3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$ 的力常数将不同窗口中的氧气分子限制在设定的反应坐标,而在一些能量较高的区域则采用 $8.37 \times 10^3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$,并缩短步长至 0.01 nm,以确保在模拟过程中窗口之间有足够重叠。以不同窗口为初始构象进行伞状抽样模拟,底物及氧气的力场参数与经典动力学模拟相同,每一个窗口的模拟时间均包括 10000 步能量最小化、50 ps 加热、50 ps 平衡及最后 200 ps 模拟,并且每 0.1 ps 记录一次数据。模拟过程中底物及蛋白质各个残基的骨架原子以 $0.418 \times 10^3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$ 的力常数进行了固定,而残基的侧链则允许自由运动。模拟使用 Amber12 软件共进行了 3 个通道共 191 个窗口的计算,所得结果均使用 WHAM 程序^[36]计算得到自由能信息。

2 结果与讨论

2.1 生物信息学分析

HOD 与 QDO 分别发现于 2 种以喹啉化合物为唯一食物来源的微生物 *Arthrobacter nitroguajacolicus* Rü61a 和 *Pseudomonas putida* 33/1^[8],而 QD 则在 *Aspergillus flavus*, *Bacillus subtilis* 等多种微生物中有所分布^[37]。对三者进行序列比对(图 2)发现,三者序列的同源性并不高,HOD 与 QDO 同为不含辅酶的加氧酶,其序列相似度为 55.8%,序列一致度为 36.4%;而与含辅酶的 QD 的序列相似度为 27.2%,序列一致度则仅有 11.6%。从图 2 也可见,QDO 与 HOD 的序列更接近一些。进一步对 3 种酶进行结构比对,也能够发现 HOD 与 QDO 的整体结构较为相似,而 QD 则有明显不同。通过以上分析,可看出 HOD 与 QDO 同作为喹啉加氧酶在序列及结构上比较相似,而非喹啉底物的加氧酶 QD 相差较多,因此本文对 HOD 氧气通道的计算对于降解喹啉类底物的酶家族也具有一定意义。

2.2 确定氧气反应位点

氧气在 HOD 中进行扩散可能有多种途径,但最后的终点都是与喹啉化合物反应前的位置。由于已知的晶体结构中只有 HOD 和 Cl^- 的共晶,为了确定氧气的反应位点,首先将这一结构(PDB ID: 2WM3)与 HOD 和 QND 的共晶(PDB ID: 2WJ4)进行叠合,以确定 Cl^- 在 QND 附近的位置,然后以其坐标为中心,共构建 26 个平均分布的氧气结合构象并进行优化。最终所有构象优化得到 2 种不同的氧气结合位点(图 3),分别为 14 种和 12 种。2 种结合构象在 HOD 中比较接近,其位置与底物 QND 之间的距离均在 0.3 nm 左右,其区别主要在于氧气与周围残基之间的弱氢键作用有所不同。2 种结合构象均

先度为 0.14, 通道 5 的优先度为 0.14, 这几条通道的优先度打分也都比较靠前, 不过其长度都明显比通道 1 要长. 几个通道在 HOD 蛋白中的分布如图 4(B) 所示.

Table 1 25 Predicted oxygen tunnels and their bottleneck radius, length, curvature and priority

ID	Bottleneck radius/nm	Length/nm	Curvature	Priority	ID	Bottleneck radius/nm	Length/nm	Curvature	Priority
1	0.095	1.674	1.38	0.42	14	0.074	3.365	1.35	0.07
2	0.070	2.213	1.52	0.30	15	0.077	4.507	3.28	0.06
3	0.079	2.624	1.34	0.18	16	0.061	3.293	2.09	0.06
4	0.070	2.419	1.36	0.14	17	0.067	3.664	1.52	0.05
5	0.064	2.705	1.56	0.14	18	0.066	3.852	2.32	0.05
6	0.062	2.054	1.70	0.13	19	0.063	3.437	2.21	0.05
7	0.077	3.221	1.42	0.13	20	0.064	3.517	2.30	0.05
8	0.074	2.875	1.41	0.12	21	0.064	4.117	1.73	0.04
9	0.077	3.380	3.34	0.12	22	0.062	3.565	2.22	0.04
10	0.064	2.353	1.31	0.12	23	0.064	3.962	1.58	0.04
11	0.064	2.712	1.38	0.11	24	0.061	4.564	2.44	0.04
12	0.064	2.524	1.55	0.09	25	0.064	4.137	1.86	0.02
13	0.066	2.970	1.73	0.09					

MDpocket 计算结果显示, HOD 共存在 4 个口袋, 分别命名为 Pocket 1, Pocket 2, Pocket 3 和 Pocket 4 [图 5(A)], Pocket 1, Pocket 2 及 Pocket 3 都靠近活性中心, Pocket 4 则距离活性中心较远. 其中, Pocket 1 为 HOD 进行催化的活性口袋, 这个口袋的体积最大, 有 $2.05 \times 10^5 \text{ nm}^3$, 其余 3 个口袋体积则相对较小. Pocket 1 由多个氨基酸残基组成, 活性中心主要包括了 Gly35, Trp36, His100, Ser101, His102, Asp126 和 His251 等氨基酸残基 [图 6(A)], 其中 Asp126 和 His251 为发挥催化作用的二联体, 活性中心位于口袋深处, 距离 HOD 表面较远, 这样可以保持良好的疏水性. Pocket 2 的体积为 $1.36 \times 10^5 \text{ nm}^3$, 由 Asp73, Phe74, Gly75, Tyr76, Gln77, Glu78, Arg187, Arg190, Val191, Asp194 和 Arg198 等氨基酸残基构成 [图 6(B)], 其中绝大部分氨基酸为亲水氨基酸, 并且该口袋位于 HOD 表面, 为亲水口袋. Trp36, Arg62, Gly63, His64, Pro68, Ser69, Glu70, Val71, Phe74, Asp179, Tyr180, Gly181, Tyr182, Asp183, Cys184 及 Arg187 等构成了 Pocket 3 [图 6(C)], 该口袋的体积较小, 只有 $0.90 \times 10^5 \text{ nm}^3$, 主要是因为该口袋开口宽度较小, 并且深度有限. Pocket 4 也位于 HOD 表面, 主要由一些亲水氨基酸组成, 其中包含了 Arg23, Asp24, Thr25, Asp26, Gly27, Ala29, Arg55, Gly91, Glu93 及 Thr94 [图 6(D)], 该口袋体积为 $1.44 \times 10^5 \text{ nm}^3$.

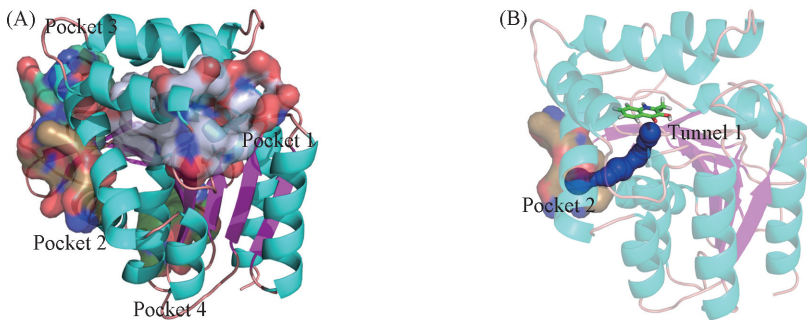


Fig.5 4 Pockets in HOD predicted by MDpocket(A) and the positional relationship between tunnel 1 and pocket 2(B)

通过与 CAVER 的计算结果比较, 可以发现通道 1 的末端连接的正是 Pocket 2 [图 5(B)], Pocket 1 的体积虽然最大, 并且也是活性口袋, 但是计算结果却发现只有通道 9 经过, 且该通道的长度为 3.380 nm, 是通道 1 的 2 倍, 曲率为 3.34, 而通道 1 的曲率仅为 1.38, 综合优先度也较低, 因此该通道并不适合氧气经过. 这主要是由于 HOD 遵循有序反应的催化机制^[12], 喹啉底物 QND 首先与酶形成复合物, 然后再与氧气结合, 而氧气的结合位点处于喹啉底物的 Re 面下方由 Trp36 和 His102 骨架所形成的氧洞, 并会从该面进攻底物的 C2 位点, 如果氧气从 Pocket 1 直接进入活性中心后会处于底物

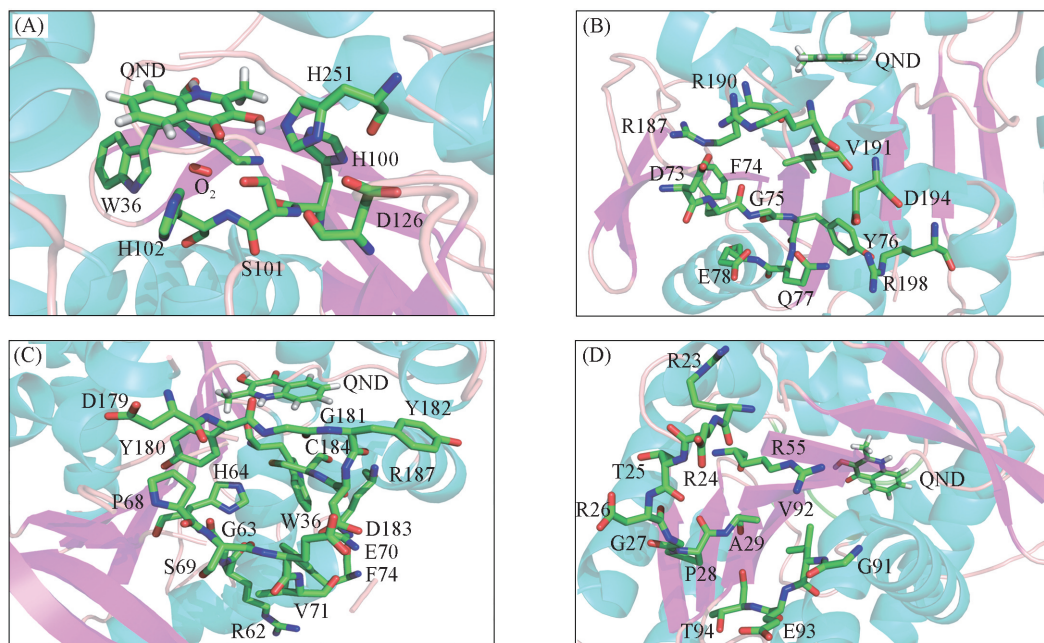


Fig.6 Active site in pocket 1(A), amino acid compositions of pocket 2(B), pocket 3(C) and pocket 4(D)

的 Si 面上方, 那么氧气就需要继续运动至喹啉化合物的 Re 面, 这会使氧气不能快速结合至反应位点, 因此氧气从下方的通道直接进入活性中心将会更加有利于反应的发生. 结合 CAVER 和 MDpocket 的计算结果, 发现通道 1 的优先度是最高的, 且位于底物的 Re 面, 并且经过 Pocket 2, 因此可认为氧气有比较大的概率经过通道 1 到达活性口袋.

2.4 随机加速分子动力学模拟

由于 CAVER 和 MDpocket 的计算结果都基于 HOD 的晶体结构, 这是静态结果, 因此又进行了动态的 RAMD 模拟来进一步搜寻和确认可能存在的氧气通道. 将时间步长值设为 10, 30, 50, 然后分别进行了 20 次独立重复的随机加速分子动力学模拟, 共模拟得到 60 条轨迹. 将模拟结果分别与前面预测得到的各条通道进行对比, 结果列于表 2. 当时间步长值设为 10 时, 20 条轨迹中氧气从通道 1 经过的有 9 条, 从通道 8 经过的有 5 条; 当时间步长值设为 30 时, 20 条轨迹中氧气从通道 1 经过的有 8 条, 从通道 8 经过的有 4 条; 当时间步长值为 50 时, 20 条轨迹中氧气从通道 1 经过的有 11 条, 从通道 8 经过的有 1 条. 在共 60 条轨迹中, 氧气从通道 1 经过的有 28 条, 从通道 8 经过的有 10 条, 其余通道则均较少. 根据静态 CAVER 和 MDpocket 的计算结果分析可得氧气的主要通道为通道 1, 而动态的随机加速分子动力学模拟结果则印证了这一结论, 更加确认了通道 1 是真实体系下的氧气通道. 通道 8 虽然各项参数并不占优势, 却也有一定的几率让氧气通过, 因此, 在伞状抽样模拟中也将其列入了计算范围. 此外, 从 RAMD 计算的结果也可见, 当底物 QND 存在于反应口袋中时, 氧气

Table 2 Results of the RAMD simulation

Tunnel	Time step			Sum
	10	30	50	
1	9	8	11	28
2	2	1	0	3
3	1	2	0	3
4	1	1	0	2
5	1	3	0	4
8	5	4	1	10
Others	1	1	8	10
Sum	20	20	20	60

很难从底物通道逸出到蛋白之外, 这也进一步确证了氧气与底物所采用的进出通道是不同的.

2.5 伞状抽样自由能计算

由于 RAMD 模拟也受到所使用力常数大小的限制, 无法真正模拟实际条件下氧气的自由扩散, 因此进一步通过伞状抽样的方法对各个通道的自由能进行计算, 以进一步确认 HOD 的氧气通道. 选取了排名靠前的通道 1、通道 2 及 RAMD 计算中也有较高氧气逸出概率的通道 8 作为计算对象, 在首次计算中将抽样的窗口设定为 0.03 nm , 谐振力常数设定为 $4.18 \times 10^3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$. 然后观察所得到的

反应坐标分布, 在部分能垒较高、重叠较差的区域进一步将窗口缩减为 0.01 nm, 力常数增加为 $8.37 \times 10^3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$ 进行补充计算, 结果如图 7 所示. 可见, 各个窗口之间都有较好的重叠, 图中方框部分即为增加力常数的几个窗口. 其中, 通道 1 和通道 2 的模拟长度均在 1.50 nm 左右, 而通道 8 则相对明显长一些, 达到 2.40 nm, 所有通道均确保氧气最终位置已经逸出到蛋白之外. 此处反应坐标的长度为氧气与底物之间的直线距离, 与软件预测的通道长度有所不同.

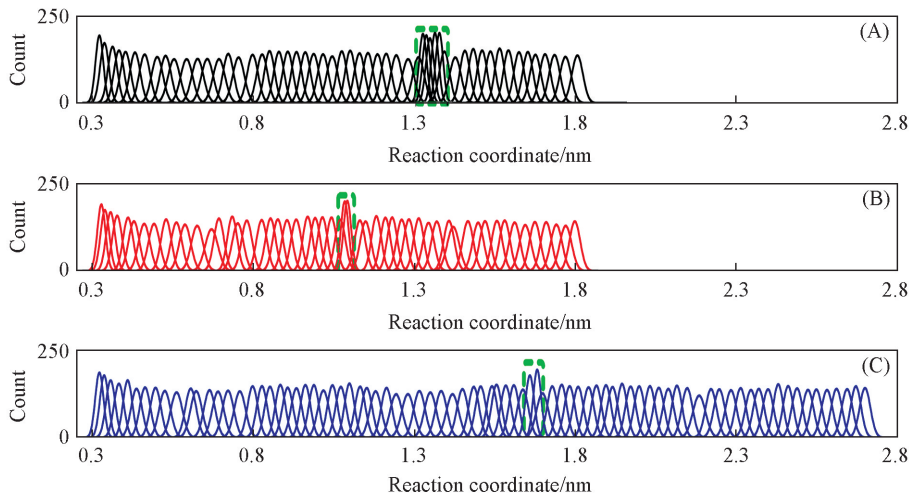


Fig.7 Sampling distribution of the three tunnels along the reaction coordinate

(A) Tunnel 1; (B) tunnel 2; (C) tunnel 8.

根据伞状抽样得到的各个窗口数据, 利用 WHAM 计算得到了各个通道的自由能曲线(图 8). 可以看出, 3 条通道在 0.35 nm 处均有最小值, 此处即为氧气的反应位点, 这与量化计算优化的结果相吻合. 因为此处 3 条通道中的氧气在结构上是一致的, 为方便对比, 将 3 条通道在此处的能量均设定为零点. 从图 8 可以看出, 通道 1 的能垒位于 1.35 nm 处, 其能量值为 25.9 kJ/mol, 通道 2 的能垒位于 0.65 nm 处, 其能量值为 28.5 kJ/mol, 通道 8 的能垒位于 1.35 nm 左右, 其能量值为 22.6 kJ/mol, 通道 8 在 1.90 nm 处还有一个能量为 -3.35 kJ/mol 的极小点, 因此通道 8 的整体能垒为 25.9 kJ/mol. 由于伞状抽样模拟的方向与氧气扩散进入蛋白的方向是相反的, 因此实际扩散过程的起点应该是氧气在溶液中溶解的状态, 虽然 3 条通道的抽样窗口最终均位于蛋白之外, 但可以看到其能量值有很大的不同, 其中通道 1 在蛋白之外窗口的能量明显低于另外 2 条通道, 说明氧气在此处有一定的稳定作用. 考虑到利用 MDpocket 软件预测得到的 Pocket 2 即位于通道 1 的末端[图 5(A)], 这表明此口袋可能具有结合氧气的作用, 而这将有利于酶蛋白将氧气首先富集于表面, 增加氧气扩散进入反应位点的概率. 虽然无法通过伞状抽样的方法较好地评估氧气在溶液中自由状态的能量, 但考虑到蛋白内部的极性环境要弱于水溶液的极性, 而氧气倾向于较为疏水的环境, 可以认为氧气在溶液中的能量要稍高于在蛋白内部的能量零点. 因此, 从自由能的角度来看, 通道 1 与通道 8 的扩散能垒均在 25.9 kJ/mol 左右, 而通道 2 的扩散能垒则在 28.5 kJ/mol 左右. 这一结果能够很好地解释 RAMD 的模拟结果, 首先通道 2 的能垒较高, 因此氧气逸出的概率较低, 其次通道 8 的能垒并不是很高, 因此在 RAMD 的模拟中也有较高的氧气逸出概率, 但由于其长度要远长于前 2 条通道, 使氧气在其中的自由扩散受到较大影响.

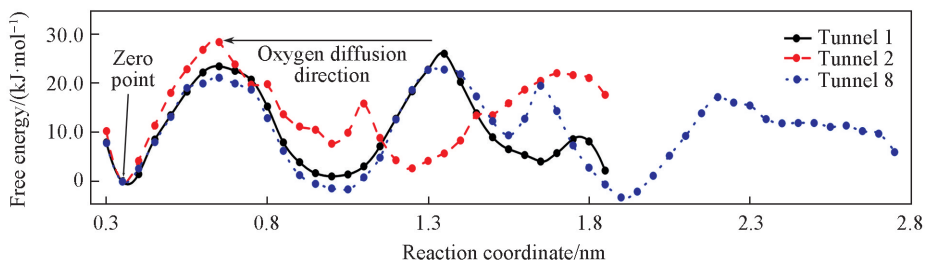


Fig.8 Potential mean force calculated by WHAM program

从以上结果可以看出, 评估氧气通道要考虑自由能垒及通道长度等多方面因素, 而自由能垒既与通道的狭窄相关, 也与通道内各个残基与氧气的相互作用有关. 观察通道 1 在 1.35 nm 能垒处的残基为 Tyr76, 其造成能垒较高的原因应当主要是空间位阻作用, 酪氨酸的苯环结构所占空间较大, 因此可能会阻碍氧气的自由扩散, 如果将其突变为体积较小的残基, 则有可能进一步降低氧气进出通道所需的能量, 从而提高酶蛋白的催化效率.

3 结 论

通过生物信息学分析、量化计算、CAVER 和 MDpocket 预测、随机加速分子动力学及伞状抽样分子动力学研究了 HOD 的氧气扩散途径. 生物信息学分析结果显示, 喹啉加氧酶在序列和结构上较为相似; 计算表明 HOD 中氧气的结合位点包埋于活性口袋深处; 静态的 CAVER 和 MDpocket 预测出 HOD 可能的氧气通道, 其中通道 1 的打分最高; 动态的分子动力学模拟证明氧气从通道 1 扩散出去的概率最高, 其所需的自由能垒最低, 通道长度最短, 而且通道在蛋白表面有一个稳定氧气的口袋. 通道 1 位于喹啉底物的 Re 面, 氧气的进攻位点也处于 Re 面. 计算结果不仅解释了 HOD 催化的反应动力学及立体选择性, 同时也为 HOD 的酶工程改造提供了理论指导.

参 考 文 献

- [1] Wang L., Li Y., Yang D., *Process Biochem.*, **2010**, 45(6), 919—928
- [2] Neuwoehner J., Reineke A. K., Hollender J., Eisentraeger A., *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2009**, 72(3), 819—827
- [3] Sideropoulos A. S., Specht S. M., *Curr. Microbiol.*, **1984**, 11(2), 59—65
- [4] Hirao K., Shinohara Y., Tsuda H., Fukushima S., Takahashi M., *Cancer Res.*, **1976**, 36(2 Part 1), 329—335
- [5] Betz A., Facey S. J., Hauer B., Tshisuaka B., Lingens F., *J. Basic Microbiol.*, **2000**, 40(1), 7—23
- [6] Fetzner S., Tshisuaka B., Lingens F., Kappl R., Hüttermann J., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **1998**, 37(5), 576—597
- [7] Hernandez-Ortega A., Quesne M. G., Bui S., Heuts D. P., Steiner R. A., Heyes D. J., de Visser S. P., Scrutton N. S., *J. Biol. Chem.*, **2014**, 289(12), 8620—8632
- [8] Steiner R. A., Janssen H. J., Roversi P., Oakley A. J., Fetzner S., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2010**, 107(2), 657—662
- [9] Fischer F., Künne S., Fetzner S., *J. Bacteriol.*, **1999**, 181(18), 5725—5733
- [10] Baas B. J., Poddar H., Geertsema E. M., Rozeboom H. J., de Vries M. P., Permentier H. P., Thunnissen A. M., Poelarends G. J., *Biochemistry*, **2015**, 54(5), 1219—1232
- [11] Fetzner S., Steiner R. A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2010**, 86(3), 791—804
- [12] Frerichs-Deeken U., Fetzner S., *Curr. Biol.*, **2005**, 51(5), 344—352
- [13] Calhoun D. B., Vanderkooi J. M., Englander S. W., *Biochemistry*, **1983**, 22(7), 1533—1539
- [14] Oliveira A. S. F., Damas J. M., Baptista A. M., Soares C. M., *PLoS Comput. Biol.*, **2014**, 10(12), e1004010
- [15] Shadrina M. S., English A. M., Peshlherbe G. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134(27), 11177—11184
- [16] Saam J., Rosini E., Molla G., Schulten K., Pollegioni L., Ghisla S., *J. Biol. Chem.*, **2010**, 285(32), 24439—24446
- [17] Baron R., Riley C., Chenprakhon P., Thotsaporn K., Winter R. T., Alfieri A., Fomeris F., van Berkel W. J., Chaiyen P., Fraaije M. W., Mattevi A., McCammon J. A., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2009**, 106(26), 10603—10608
- [18] Saam J., Ivanov I., Walther M., Holzhütter H. G., Kuhn H., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2007**, 104(33), 13319—13324
- [19] Klinman J. P., *Acc. Chem. Res.*, **2007**, 40(5), 325—333
- [20] Cohen J., Schulten K., *Biophys. J.*, **2007**, 93(10), 3591—3600
- [21] Pesce A., Nardini M., LaBarre M., Richard C., Wittenberg J. B., Wittenberg B. A., Guertin M., Bolognesi M., *BBA-Proteins and Proteomics*, **2011**, 1814(6), 810—816
- [22] Milani M., Pesce A., Ouellet Y., Dewilde S., Friedman J., Ascenzi P., Guertin M., Bolognesi M., *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279(20), 21520—21525
- [23] Colloc'h N., Gabison L., Monard G., Altarsha M., Chiadmi M., Marassio G., Sopkova-de O. S. J., El H. M., Castro B., Abbraini J. H., Prangé T., *Biophys. J.*, **2008**, 95(5), 2415—2422
- [24] Boechi L., Arrar M., Martí M. A., Olson J. S., Roitberg A. E., Estrin D. A., *J. Biol. Chem.*, **2013**, 288(9), 6754—6762
- [25] Vassiliev S., Zaraiskaya T., Bruce D., *BBA-Bioenergetics*, **2013**, 1827(10), 1148—1155
- [26] Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Scalmani G., Barone V., Mennucci B., Petersson G. A., Nakatsuji H., Caricato M., Li X., Hratchian H. P., Izmaylov A. F., Bloino J., Zheng G., Sonnenberg J. L., Hada M.,

- Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Vreven T., Montgomery J. A. Jr., Peralta J. E., Ogliaro F., Bearpark M., Heyd J. J., Brothers E., Kudin K. N., Staroverov V. N., Kobayashi R., Normand J., Raghavachari K., Rendell A., Burant J. C., Iyengar S. S., Tomasi J., Cossi M., Rega N., Millam N. J., Klene M., Knox J. E., Cross J. B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R. E., Yazyev O., Austin A. J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J. W., Martin R. L., Morokuma K., Zakrzewski V. G., Voth G. A., Salvador P., Dannenberg J. J., Dapprich S., Daniels A. D., Farkas Ö., Foresman J. B., Ortiz J. V., Cioslowski J., Fox D. J., *Gaussian 09, Revision A. 1*, Gaussian Inc., Wallingford CT, **2009**
- [27] Chovancova E., Pavelka A., Benes P., Strnad O., Brezovsky J., Kozlikova B., Gora A., Sustr V., Klvana M., Medek P., Biedermannova L., Sochor J., Damborsky J., *PLoS Comput. Biol.*, **2012**, *8*(10), e1002708
- [28] Schmidtke P., Bidon-Chanal A., Luque F. J., Barril X., *Bioinformatics*, **2011**, *27*(23), 3276—3285
- [29] Durrant J. D., Votapka L., Sørensen J., Amaro R. E., *J. Chem. Theory Comput.*, **2014**, *10*(11), 5047—5056
- [30] Hamelberg D., Mongan J., McCammon J. A., *J. Chem. Phys.*, **2004**, *120*(24), 11919—11929
- [31] Burendahl S., Danculescu C., Nilsson L., *Proteins; Struct., Funct., Bioinf.*, **2009**, *77*(4), 842—856
- [32] Vashisth H., Abrams C. F., *Biophys. J.*, **2008**, *95*(9), 4193—4204
- [33] Schleinkofer K., Sudarko, Winn P. J., Lüdemann S. K., Wade R. C., *EMBO Rep.*, **2005**, *6*(6), 584—589
- [34] Case D. A., Darden T. A., Cheatham III T. E., Simmerling C. L., Wang J., Duke R. E., Luo R., Walker R. C., Zhang W., Merz K. M., Roberts B., Hayik S., Roitberg A., Seabra G., Swails J., Götz A. W., Kolossváry I., Wong K. F., Paesani F., Vanicek J., Wolf R. M., Liu J., Wu X., Brozell S. R., Steinbrecher T., Gohlke H., Cai Q., Ye X., Wang J., Hsieh M. J., Cui G., Roe D. R., Mathews D. H., Seetin M. G., Salomon-Ferrer R., Sagui C., Babin V., Luchko T., Gusarov S., Kovalenko A., Kollman P. A., *AMBER 12*, University of California, San Francisco, **2012**
- [35] Phillips J. C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R. D., Kale L., Schulten K., *J. Comput. Chem.*, **2005**, *26*, 1781—1802
- [36] Grossfield A., *WHAM; the Weighted Histogram Analysis Method, Version 2.0.9*, <http://membrane.urmc.rochester.edu/content/wham>
- [37] Pap J. S., Matuz A., Baráth G., Kripli B., Giorgi M., Speier G., Kaizer J., *J. Inorg. Biochem.*, **2012**, *108*, 15—21

Theoretical Analysis of Oxygen Diffusion in the Micro-channels of Quinoline Oxygenase[†]

ZHOU Chao, SHI Ting, ZHAO Yilei, WANG Xiaolei*

(School of Life Sciences and Biotechnology, State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract Oxygen diffusion pathways of quinoline oxygenase (HOD) were investigated by bioinformatics analysis, quantum chemical optimization, CAVER and MD pocket prediction, random accelerated molecular dynamics simulations and umbrella sampling. The results show that the pre-reaction site of oxygen does locate inside the active pocket, and there exists several possible oxygen tunnels in HOD, in which the one with shortest length has the highest priority. Random accelerated molecular dynamics proved that oxygen has the highest probability to exit from this tunnel, and umbrella sampling further verified its free energy for oxygen passing by is the lowest. The tunnel ended at the binding site of oxygen located on the Re-face of the substrate, which is consistent with previous studies. These results better illuminate the kinetics and the stereo-selectivity of the catalytic reaction in HOD, and also provide theoretical guidance to further experimentally improve the efficiency of oxygen usage by enzyme.

Keywords Quinoline oxygenase; Oxygendiffusion; Random accelerated molecular dynamics; Umbrella sampling

(Ed.: Y, Z, S)

[†] Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos.21377085, 21303101), the China Postdoctoral Science Foundation (Nos.2014T70413, 2014M561463) and the Center for High Performance Computing of Shanghai Jiaotong University, China.