

# 微生物糖苷酶的新型突变酶——硫代糖苷酶的产生及应用\*

卢丽丽 肖敏\*\* 赵晗

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

**摘要** 微生物糖苷酶的酸碱功能氨基酸突变酶能催化硫代糖苷的合成,这类酶被称为硫代糖苷酶。目前发展的硫代糖苷酶有 $\beta$ -硫代葡萄糖苷酶、 $\beta$ -硫代甘露糖苷酶、 $\beta$ -硫代半乳糖苷酶、 $\alpha$ -硫代木糖苷酶和 $\alpha$ -硫代葡萄糖苷酶,来源于细菌和古细菌,能合成多种硫代糖苷。最近,硫代糖苷酶被应用于糖蛋白的糖基化修饰,首次人工合成硫代糖蛋白。微生物糖苷酶合成功能的新延伸,对糖生物学、生物技术和制药业的发展将有着重要意义。

**关键词** 糖苷酶,硫代糖苷酶,合成

中图分类号:Q5,Q81 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)04-0769-04

## Novel Mutants of Microbial Glycosidases——Generation and Application of Thioglycosidases\*

LU Li-Li XIAO Min\*\* ZHAO Han

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100)

**Abstract** Acid/base mutants of glycosidases, namely thioglycosidases, are able to catalyze thioglycosides synthesis. Now, many thioglycosidases, including  $\beta$ -thioglucosidase,  $\beta$ -thiomannosidase,  $\beta$ -thiogalactosidase,  $\alpha$ -thioxylidase and  $\alpha$ -thioglucosidase, have been developed from bacteria and archaeobacteria, and applied in synthesizing various thioglycosidases. Recently, thioglycosidases have been used to glycosylate the glycoprotein and firstly generate the thioglycoprotein. The novel extended synthetic function of glycosidases would promote the development of glycobiology, biotechnology and pharmacy.

**Key words** Glycosidases, Thioglycosidases, Synthesis

微生物糖苷酶来源广泛,种类繁多。有些糖苷酶除具有水解活性外,还具有转基活性,该性质使其成为糖类合成的重要工具,被用于大规模合成多种O-糖苷。近三年研究发现,微生物糖苷酶的一类新型突变酶即硫代糖苷酶(thioglycosidases)能催化硫代糖苷(thioglycosides)的合成,这一发现引起了科学家的极大兴趣。

硫代糖苷是O-糖苷类似物,糖单位组成和空间结构与O-糖苷类似,不同之处仅在于糖苷键通过硫原子起连接作用,不易被糖苷酶水解,具有重要的研究价值:①由于化学水解和酶解速率低,可以解决O-糖苷易被内源糖苷酶水解的问题,从而作为O-糖苷替代品,应用于药物疗法<sup>[1-3]</sup>;②作为糖苷酶的竞争性抑制剂,与糖苷酶形成稳定的复合物用于X-

射线晶体结构分析<sup>[4,5]</sup>,研究糖苷酶特异性和作用机制,探索其突变或缺陷引起人类疾病的分子机理;③用于制备亲和树脂纯化糖苷酶蛋白<sup>[6]</sup>;④作为非降解性配体用于凝集素研究等等<sup>[7,8]</sup>。由于硫代糖苷在生物技术和制药业方面的潜在价值越来越受到关注,相应地,其大量获得也成为当今研究的热点。传统的化学法合成步骤繁琐,糖基转移酶法合成供体昂贵且酶来源有限。而硫代糖苷酶作为一类新型催化剂,其微生物来源十分广泛,合成方法简单,合成产物种类丰富,甚至还能合成硫代糖蛋白,用于药用糖蛋白的生产,因而显示出极大的优点,具有很好的应用前景。

\* 国家“863”高技术研究发展计划项目(No. 2006AA10Z338)

国家十五攻关计划项目(No. 2004BA713B04-06)

\*\* 通讯作者 Tel: 0531-88365128, E-mail: minxiao@sdu.edu.cn

收稿日期 2006-09-27, 修回日期 2006-11-22

## 1 硫代糖苷酶的产生及作用机制

天然糖苷酶催化合成反应时,其催化中心酸碱功能氨基酸和亲核体氨基酸(谷氨酸或天冬氨酸)的一对羧基起着重要作用,分别作为广义酸碱(acid/base)和亲核体(nucleophile),通过双置换机制保持构型不变来催化两步反应<sup>[9]</sup>:第一步是酶的糖基化,亲核体羧基直接作用于底物,形成共价键糖基-酶中间物,酸碱羧基先进行酸催化,提供质子,促使底物离去基团的离去;反应第二步是酶的去糖基化,酸碱羧基进行碱催化,激活糖受体分子,发生转糖基反应合成糖类(图1a)。但天然糖苷酶通常只能合成O-糖苷,不能以SH-糖为受体进行转糖基反应。而当天然糖苷酶酸碱功能氨基酸被不带负电

荷的氨基酸(如丙氨酸)取代后,形成的突变酶能以二硝基苯糖苷或氟代糖为糖基供体,以SH-糖为糖基受体高效合成硫代糖苷,因而被称为硫代糖苷酶。这类酶由于缺少酸碱功能氨基酸,不能提供促进糖基供体离去基团离去的酸催化作用和激活糖受体分子发生转糖基的碱催化作用,导致酶的糖基化和去糖基化两步反应速率都会降低。而当以二硝基苯糖苷等带有强离去基团的糖苷为糖基供体时,由于不需要提供酸催化,第一步反应会加快。当以SH-糖为糖基受体时,由于SH-糖亲核性比OH-糖强,糖基-酶中间物不需要碱催化即可转糖基到受体分子上(图1b),第二步反应也会加快。最终形成的硫代糖苷产物因离去基团解离能力很弱,不能被酶水解,可以大量积累<sup>[10]</sup>。

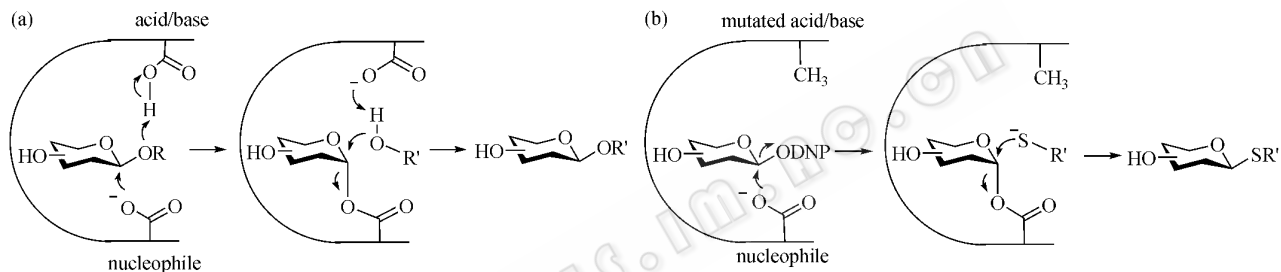


图1 糖苷酶和硫代糖苷酶催化糖类合成的机制<sup>[9,10]</sup>

(a)糖苷酶;(b)硫代糖苷酶

## 2 硫代糖苷酶的获得及筛选

硫代糖苷酶的获得,首先要确定糖苷酶的酸碱催化位点,可采用定点突变的方法,即将不同来源的酶序列进行同源性比对,对完全同源的谷氨酸或天冬氨酸分别进行突变:若突变酶水解简单O-糖苷(需要提供酸催化)的速率大大低于1-氟代糖(不需要提供酸催化),则突变位点为酸碱功能氨基酸;若反应中加入外源亲核剂如叠氮化物,突变酶反应速率大大提高,且生成的糖基叠氮化物构型不变,则可进一步确定该位点的酸碱催化功能<sup>[11]</sup>。

糖苷酶酸碱催化位点取代的氨基酸不同,形成的硫代糖苷酶的活性也存在差异,这就需要在该位点进行饱和突变,进一步筛选高效突变酶。目前有两种筛选方法:一种是常见的低通量筛选方法,用薄层层析(TLC)检测突变酶的转糖基产物;另一种是高通量筛选方法,在反应体系中加入筛选酶,该酶不水解带荧光基团的糖基受体,只水解带荧光基团的硫代糖苷产物,通过检测产物释放的荧光来进行筛

选。Mullegger等在对土壤杆菌(*Agrobacterium* sp.) $\beta$ -葡糖苷酶(Abg, EC3.2.1.21)的酸碱催化位点进行饱和和突变时,首次使用了上述两种筛选方法,证实了其有效性。在TLC筛选中,将重组子细胞粗酶液与2,4-二硝基苯- $\beta$ -葡糖苷和甲基伞形酮-4-巯基-葡糖苷反应,产物用荧光TLC板分离检测,共筛选到10种有活性的突变酶,包括Abg E171A和E171G等。在筛选酶联合筛选中,考虑到二硝基苯离去基团会淬灭甲基伞形酮的荧光,选择葡糖基叠氮化物为糖基供体,糖基受体不变,筛选酶为来源于尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* sp. *lycopersi*)的内切葡聚糖酶1(EG1, EC3.2.1),EG1不水解甲基伞形酮-4-巯基-葡糖苷,只水解转糖基产物(图2)。该方法筛选到1种有活性的突变酶Abg E171Q。糖基供体的不同导致两种方法的筛选结果也不一致,将突变酶进行动力学分析,结果表明E171Q催化多种糖基供体转糖基到甲基伞形酮-4-巯基-葡糖苷的效率均高于最初获得的突变酶E171A(见3.1),且以糖基叠氮化物为供体时的反应速率提高了100倍;当糖基受体为甲

基伞形酮-4-巯基-半乳糖苷时, Abg E171G 催化半乳糖基或其它糖基转移的效率最高<sup>[12]</sup>。

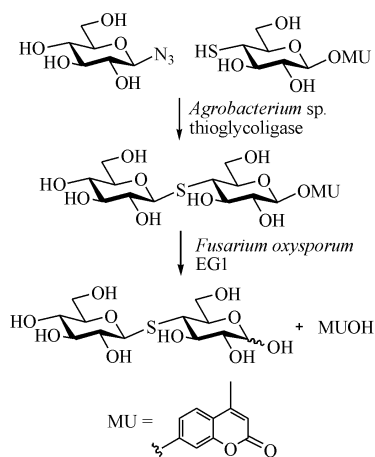


图2 应用筛选酶筛选硫代糖苷酶的机制<sup>[12]</sup>

### 3 不同硫代糖苷酶的微生物来源及其特征

#### 3.1 $\beta$ -硫代葡萄糖苷酶

Jahn 等 2003 年首次报道了硫代糖苷酶, 通过点突变技术在土壤杆菌 Abg 催化中心用丙氨酸取代第 171 位谷氨酸, 造成酸碱功能氨基酸突变, 形成的硫代葡萄糖苷酶 Abg E171A 能以 2,4-二硝基苯- $\beta$ -葡萄糖苷和硝基苯-巯基-糖苷为底物, 合成  $\beta$ -1,4-硫代糖苷, 产量为 64% ~ 85%<sup>[10,13]</sup>。突变酶的区域选择性与天然糖苷酶不一致, 受体分子中巯基的位置决定其区域选择性<sup>[10]</sup>。Mullegger 等 2005 年在 Abg 酸碱催化位点进行饱和突变, 获得了反应速率更高的突变酶 Abg E171Q 和 Abg E171G<sup>[12]</sup>, 进一步丰富了硫代糖苷酶酶库。

#### 3.2 $\beta$ -硫代甘露糖苷酶

Jahn 等 2003 年同样采用点突变技术, 对粪肥纤维单胞菌( *Cellulomonas fimi* )  $\beta$ -甘露糖苷酶( Man2A, EC3.2.1.25 )进行基因改造, 用丙氨酸取代第 429 位谷氨酸, 形成的硫代甘露糖苷酶 Man2A E429A 能以 2,5-二硝基苯- $\beta$ -甘露糖苷和硝基苯-巯基-糖苷为底物合成  $\beta$ -1,4-硫代糖苷, 产量为 35% ~ 82%<sup>[12]</sup>。

#### 3.3 $\beta$ -硫代半乳糖苷酶

Kim 等 2006 年在木薯萎蔫病黄单胞菌( *Xanthomonas manihotis* )  $\beta$ -半乳糖苷酶( BgaX, EC3.2.1.23 )的酸碱催化位点进行点突变, 形成的硫代半乳糖苷酶 BgaX E184A 能以 3,4-二硝基苯- $\beta$ -半乳糖苷为糖基供体, 以对硝基苯-3-巯基-葡萄糖苷、对硝基苯-

3-巯基-半乳糖苷和对硝基苯-4-巯基-葡萄糖苷为糖基受体合成  $\beta$ -1,3 和  $\beta$ -1,4-硫代二糖, 产量达 80% 以上。由于 Gal- $\beta$ -1,3/1,4 糖苷键位于具有药用价值的神经节苷脂及糖蛋白糖链中, 因而 BgaX E184A 将成为合成稳定的神经节苷脂及表面抗原类似物的有力工具<sup>[14]</sup>。

#### 3.4 $\alpha$ -硫代木糖苷酶和 $\alpha$ -硫代葡萄糖苷酶

Kim 等 2006 年首次报道了  $\alpha$ -硫代糖苷酶, 对大肠杆菌( *Escherichia coli* )  $\alpha$ -木糖苷酶( YicI, EC3.2.1 )和硫磺矿硫化叶菌( *Sulfolobus solfataricus* )  $\alpha$ -葡萄糖苷酶( MalA, EC3.2.1.20 )酸碱催化位点的天冬氨酸分别进行突变, 产生突变酶 YicI D482A 和 MalA D416A, 获得了两个来源于糖苷酶家族 31 的硫代糖苷酶。其中, YicI D482A 能以  $\alpha$ -氟代木糖为糖基供体, 以对硝基苯-4-巯基-葡萄糖苷、对硝基苯-4-巯基-木糖苷、对硝基苯-6-巯基-葡萄糖苷为糖基受体, 分别合成 3 种  $\alpha$ -1,4 或  $\alpha$ -1,6-二糖, 产量为 41% ~ 86% ; MalA D416A 能以  $\alpha$ -氟代葡萄糖和对硝基苯-4-巯基-葡萄糖苷为底物合成  $\alpha$ -1,4-二糖, 产量为 48%<sup>[15]</sup>。

YicI D482A 和 MalA D416A 的出现, 对研究糖苷酶家族 31 的其它酶具有重要意义。糖苷酶家族 31 包括很多具有重要药理学意义的人源酶, 如溶酶体  $\alpha$ -葡萄糖苷酶( GAA )和内质网葡萄糖苷酶 II 等。Lovering 等于 2005 年首次对 *E. coli* YicI 进行了结构分析, 为来源于高等生物糖苷酶的研究提供了结构框架。但进一步研究酶的底物特异性和作用机制需要基于酶-底物复合物的结构信息。硫代糖苷由于不被化学降解及酶水解且构象与天然的 O-糖苷底物相似, 因而是进行这类研究的有用探针。实验表明 YicI D482A 的 3 种硫代糖苷产物都是 YicI 天然酶的抑制剂。其中,  $\alpha$ -1,6-二糖产物与 YicI 天然底物的不同之处仅在于糖苷键用硫原子取代了氧原子, 其作为竞争性抑制剂的  $K_i$  值为 2  $\mu$ M。Kim 等将该抑制剂与 YicI 形成的复合物进行了 X-射线晶体结构分析<sup>[15]</sup>, 所获得的信息对于设计出基于酶蛋白结构的抑制剂作为化学伴侣治疗因 GAA 缺陷或功能紊乱而导致的遗传性糖原贮积病有重要价值。

### 4 硫代糖苷酶应用于硫代糖蛋白合成

Mullegger 等 2006 年应用来源于土壤杆菌的硫代葡萄糖苷酶对化学修饰的天然蛋白进行糖基化, 首

次获得硫代糖蛋白(thioglycoprotein)<sup>[16]</sup>。该研究选择环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)内切木聚糖酶(Bcx, EC3.2.1.8)作为模式蛋白进行糖基化修饰。Bcx具备很多特点:①分子量小,大小与细胞因子相同,而糖基化对一些细胞因子的活性和血清半衰期非常重要;②3D结构已经获得;③分子结构中没有半胱氨酸,可以通过体外突变将唯一的巯基引入到酶蛋白表面,允许糖分子对其进行位点选择性修饰。

Mullegger等先通过点突变将巯基引入Bcx,形成突变酶Bcx S22C,然后与4'-巯基糖类似物发生化学反应,生成SH-糖蛋白Bcx-4SG2;再应用Abg E171G以2,5-二硝基苯-β-半乳糖苷为糖基供体,转半乳糖基到Bcx-4SG2分子上,生成硫代糖蛋白GalSG2-Bcx(图3)。GalSG2-Bcx的糖结构不能被刀豆β-半乳糖苷酶及Abg天然酶水解,证实了抗糖苷酶水解的硫代糖苷键的存在。此外,GalSG2-Bcx能被脑膜炎球菌(*Neisseria meningitidis*)α-1,4-半乳糖基转移酶(LgtC, EC2.4.1)和空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)α-2,3-唾液酸转移酶(Cst1, EC2.4.99)糖基化。由于LgtC和Cst1对乳糖受体具有高度特异性,这一研究证实了GalSG2-Bcx存在硫代乳糖分子结构,且硫原子的存在不影响糖基转移酶的反应活性。

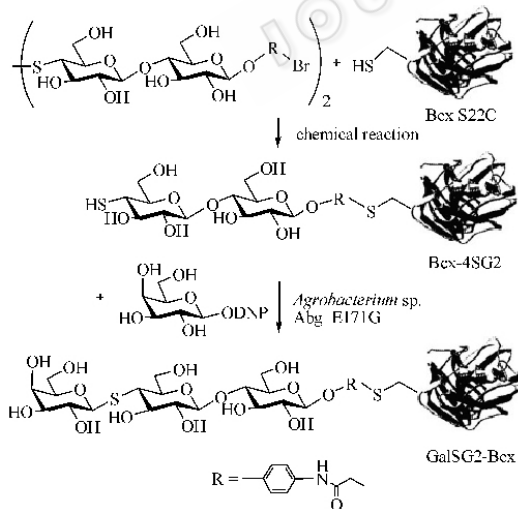


图3 硫代糖苷酶应用于硫代糖蛋白的合成<sup>[16]</sup>

硫代糖蛋白的糖结构抗糖苷酶水解,并且能作为受体被糖基转移酶进一步糖基化,预示着上述方法用于合成代谢稳定的糖蛋白结构的巨大潜能。现在科学家正致力于将硫代糖苷酶应用到其它糖型合成研究,以期获得血清半衰期延长的药用糖蛋白。

## 5 展望

硫代糖苷作为稳定的O-糖苷类似物,在O-糖苷替代疗法及糖苷酶研究领域有着重要的应用价值。近年来发现某些糖苷酶的抑制剂可作为化学伴侣帮助蛋白正确折叠,用于治疗糖苷酶缺陷性疾病。硫代糖苷作为糖苷酶的抑制剂在这一领域具有巨大的应用潜能。此外,糖蛋白进行硫代糖基化后能抗糖苷酶水解,这对延长药用蛋白的血清半衰期有重要意义。随着硫代糖苷重要作用的日益突现,其合成备受关注。硫代糖苷酶的出现,使得硫代糖苷的大量合成成为可能。由于微生物糖苷酶来源丰富,因而硫代糖苷酶的发展有很大的空间,其数量将会逐渐增多,相应地也会极大地丰富硫代糖苷和硫代糖蛋白的种类,使其潜在的应用价值得以充分体现。

## 参考文献

- [1] Witczak Z J, Culhane J M. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 69(3): 237 ~ 244.
- [2] Bundle D R, Rich J R, Jacques S, et al. Angew Chem Int Ed Engl, 2005, 44(47): 7725 ~ 7729.
- [3] Yuasa H. and Hashimoto H. Trends Glycosci Glycotechnol, 2001, 13(69): 31 ~ 55.
- [4] Legler G. Adv Carbohydr Chem Biochem, 1990, 48: 319 ~ 384.
- [5] Driguez H. ChemBiochem, 2001, 2(5): 311 ~ 318.
- [6] Orgeret C, Seillier E, Gautier C, et al. Carbohydr Res, 1992, 224: 29 ~ 40.
- [7] Witczak Z J. Curr Med Chem, 1999, 6(2): 165 ~ 178.
- [8] Dey P M, Witczak Z J. Mini Rev Med Chem, 2003, 3(4): 271 ~ 280.
- [9] McCarter J D, Withers S G. Curr Opin Struct Biol, 1994, 4(6): 885 ~ 892.
- [10] Jahn M, Withers S G. Biocatal Biotransfor, 2003, 21(4-5): 159 ~ 166.
- [11] 卢丽丽, 肖敏, 赵晗, 等. 生物工程学报, 2006, 22(3): 351 ~ 360.
- [12] Mullegger J, Jahn M, Chen H M, et al. Protein Eng Des Sel, 2005, 18(1): 33 ~ 40.
- [13] Jahn M, Marles J, Warren R A J, et al. Angew Chem Int Ed Engl, 2003, 42(3): 352 ~ 354.
- [14] Kim Y W, Chen H, Kim J H et al. FEBS Lett, 2006, 580(18): 4377 ~ 4381.
- [15] Kim Y W, Lovering A L, Chen H, et al. J Am Chem Soc, 2006, 128(7): 2202 ~ 2203.
- [16] Mullegger J, Chen H M, Warren R A, et al. Angew Chem Int Ed Engl, 2006, 45(16): 2585 ~ 2588.