

研究报告

嗜热共生杆菌内消旋-2,6-二氨基庚二酸脱氢酶中 Y76 对辅酶偏好性影响

赵雷明^{1,2}, 刘卫东², 陈曦², 王敏¹, 冯进辉², 吴洽庆², 朱敦明²

1 天津科技大学生物工程学院 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 工业酶国家工程实验室 天津市生物催化技术工程中心, 天津 300308

赵雷明, 刘卫东, 陈曦, 等. 嗜热共生杆菌内消旋-2,6-二氨基庚二酸脱氢酶中 Y76 对辅酶偏好性影响. 生物工程学报, 2015, 31(7): 1108–1118.

Zhao LM, Liu WD, Chen X, et al. Effect of residue Y76 on co-enzyme specificity of *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Symbiobacterium thermophilum*. Chin J Biotech, 2015, 31(7): 1108–1118.

摘要: 辅酶 NAD(H) 相比 NADP(H) 有稳定性好、价格低廉及更广的辅酶循环方法等优势, 因此在实际应用中常需将 NADP(H) 依赖型的脱氢酶改造成为 NAD(H) 依赖型的。来源于嗜热共生杆菌 *Symbiobacterium thermophilum* 的 NADP(H) 依赖型内消旋-2,6-二氨基庚二酸脱氢酶 (*meso*-2,6-diaminopimelate dehydrogenase, StDAPDH) 及其突变体酶是催化还原氨化合成 D-氨基酸的优良催化剂, 本研究试图改变其辅酶偏好性, 增强其应用优势。对其晶体结构分析可知, 氨基酸残基 Y76 距离腺嘌呤较近, R35 及 R36 和辅酶上磷酸基团有直接相互作用。依氨基酸侧链基团性质对 Y76 进行了定点突变, 发现不同突变子对两种辅酶的偏好性都发生了变化; 对与磷酸基团直接作用的 R35、R36 进行的双突变 R35S/R36V, 导致酶对 NADP⁺ 的催化活力降低; 将 R35S/R36V 和部分 Y76 突变进行了组合, 发现三突变组合以 NAD⁺ 为辅酶时的活力均大于以 NADP⁺ 为辅酶的活力, 实现了辅酶偏好性转变。这些研究工作为进一步实现 StDAPDH 的辅酶偏好性完全转变提供依据。

关键词: 氨基酸脱氢酶, 内消旋-2,6-二氨基庚二酸脱氢酶, 辅酶偏好性, 突变

Received: October 30, 2014; **Accepted:** January 19, 2015

Supported by: Key Deployment Project of Chinese Academy of Sciences (No. KSZD-EW-Z-016-3), National Natural Science Foundation of China (Nos. 21072151, 21102100), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CB710801).

Corresponding authors: Qiaqing Wu. Tel: +86-22-84861963; Fax: +86-22-84861996; E-mail: wu_qq@tib.cas.cn

Dunming Zhu. Tel: +86-22-84861962; Fax: +86-22-84861996; E-mail: zhu_dm@tib.cas.cn

中国科学院重点部署项目 (No. KSZD-EW-Z-016-3), 国家自然科学基金 (Nos. 21072151, 21102100), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CB710801) 资助。

Effect of residue Y76 on co-enzyme specificity of *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Symbiobacterium thermophilum*

Leiming Zhao^{1,2}, Weidong Liu², Xi Chen², Min Wang¹, Jinhui Feng², Qiaqing Wu², and Dunming Zhu²

¹ Key Laboratory of Industrial Microbiology Fermentation of Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

² Tianjin Biocatalysis Technology Engineering Center, National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: In industrial application of NAD(P)H-dependent dehydrogenases, NAD(H) has the advantages over NADP(H) in higher stability, lower price and wider recycling system. Recently, a *meso*-2,6-diaminopimelate dehydrogenase from *Symbiobacterium thermophilum* (StDAPDH) has been found to be a useful biocatalyst for the production of D-amino acids, but it requires NADP(H) as co-enzyme. To switch the co-enzyme specificity from NADP(H) to NAD(H), we studied the effect of Y76 on the co-enzyme specificity of StDAPDH, because the crystal structural analysis indicated that residue Y76 is near the adenine ring. The mutation of Y76 exerted significant effect on the co-enzyme specificity. Furthermore, the double mutant R35S/R36V significantly lowered the specific activity toward NADP⁺, and the combination of R35S/R36V with some of the Y76 mutants resulted in mutant enzymes favorable NAD⁺ over NADP⁺. This study should provide useful guidance for the further development of highly active NAD⁺-dependent StDAPDH by enzyme engineering.

Keywords: amino acid dehydrogenase, *meso*-diaminopimelate dehydrogenase, co-enzyme preference, mutagenesis

氨基酸脱氢酶是以氨基酸分子中-CH-NH₂为氢供体,以 NAD(P)⁺为受体的一类氧化还原酶,有严格的手性选择性。野生型的氨基酸脱氢酶多为 L-选择性^[1],利用酶催化可逆反应的特点,这类酶被成功用于光学纯 L-氨基酸的生物合成;目前已知的 D-氨基酸脱氢酶多为膜蛋白^[2-8],仅有内消旋-2,6-二氨基庚二酸脱氢酶(*meso*-2,6-D-diaminopimelate dehydrogenase) (DAPDH) (EC 1.4.1.16) 家族及它们的突变体酶可用来进行 D-氨基酸的生物合成^[9-12]。内消旋-2,6-二氨基庚二酸脱氢酶 (DAPDH) 存在于赖氨酸合成途径中,是一类 NADP⁺-依赖型的氧化还原酶,它催化可逆的内消旋-二氨基庚二酸

(*meso*-diaminopimelate, *meso*-DAP) 的 D-手性碳上的氨基氧化脱氨,生成 L-2-氨基-6-酮基庚二酸,反应方程式如图 1 所示^[13]。我们从嗜热共生杆菌 *Symbiobacterium thermophilum* 中获得一个内消旋-2,6-二氨基庚二酸脱氢酶 (StDAPDH)^[14],该酶可被直接用来还原氨化合成光学纯 D-丙氨酸,我们对其进行改造扩展了底物谱范围^[15],而且还获得了它的 X-射线晶体结构^[16],为对 StDAPDH 开展深入研究奠定了基础。

已报道的 DAPDH 家族野生型以及突变子酶均偏好于 NADP(H)^[9-12],到目前为止尚无该家族酶辅酶偏好性改造的报道。辅酶 NAD(H) 和 NADP(H) 相比而言, NAD(H) 有稳定性好、

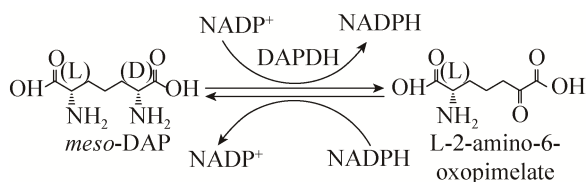


图 1 内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶催化的反应^[13]

Fig. 1 Reaction catalysed by *meso*-diaminopime dehydrogenase^[13].

价格低廉及更广的辅酶循环再生方法等优势^[17], 在实际生产应用上, 多倾向于使用 NAD(H) 依赖型的脱氢酶。对 DAPDH 进行辅酶专一性改造, 可以为 DAPDH 潜在的工业化应用提供支撑。

辅酶 NAD(H) 和 NADP(H) 的主要区别在于 2' 位上的腺嘌呤上, NADP(H) 中该位置比 NAD(H) 多连接了一个磷酸基团, 而且该位置和辅酶在催化反应中提供质子的 C₄ 的位置较远。在辅酶偏好性改造中, 常常可以通过改造

和辅酶磷酸基团结合的氨基酸残基如精氨酸 (R) 及赖氨酸 (K) 等来达到目的^[18-30] (表 1)。

除了和磷酸基团相关的基团外, Crobu 等^[31] 以及 Baroni 等^[32] 在改造铁氧化还原蛋白 NADP⁺ 还原酶时发现, 临近辅酶腺嘌呤的氨基酸残基 (H286 及 Y258) 对辅酶偏好性也有影响, 而且他们获得的仅仅 Y258 位单突变就能使辅酶偏好性完全翻转过来。

通过结构分析比较发现, StDAPDH 结构和辅酶腺嘌呤接近并可能影响辅酶偏好性的氨基酸为 Y76, 与辅酶 NADP⁺ 上磷酸基团有直接作用的基团为 R35 和 R36。对于 StDAPDH 中 Y76 对辅酶偏好性是否有影响进行了突变摸索, 此外, 还对和与辅酶 NADP⁺ 上磷酸基团有直接作用的 R35/R36 位也进行了突变尝试, 并和 Y76 的部分突变子进行了组合突变测试。本文报道相关的研究结果。

表 1 NAD(P)(H) 辅酶改造研究的总结

Table 1 Summary of NAD(P)(H) cofactor engineering studies

Enzyme	Mutation	Specificity change
2,5-diketo-D-gluconic acid reductase A	R238H	NADPH→NADH ^[18]
Xylose reductase	K270S/S271G/N272P/R276F	NADPH→NADH ^[19]
Alcohol dehydrogenase	G223D/T224I/H225N	NADPH→NADH ^[20]
Xylose reductase	E272G, D273G, S274D	NADPH→NADH ^[21]
Short side dehydrogenase Gox2181	Q20R/D43Q	NADH→NADPH ^[22]
Glutathione reductase	R198M/K199F	NADPH→NADH ^[23]
15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase	Q15K/W37R, Q15R/W37R	NADH→NADPH ^[24]
Alcohol dehydrogenase	N15G/G37D/R38V/R39S	NADP ⁺ →NAD ⁺ ^[25]
Ketol acid reductoisomerase	R58D, S61D, S63V	NADPH→NADH ^[26]
Xylitol dehydrogenase	K21A/N272D	NADPH→NADH ^[27]
Mannitol 2-dehydrogenase	E68K/D69A	NADH→NADPH ^[28]
1,5-anhydro-D-fructose reductase	A13G	NADPH→NADH ^[29]
Nitrate reductase	S920D/R932S	NADPH→NADH ^[30]

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

实验中所用感受态细胞大肠杆菌 *Escherichia coli* Top10 以及 *E. coli* BL21 (DE3) 均购自北京全式金生物技术有限公司; 突变起始质粒 pET_{32a}-*stdapdh* 为本实验室保存。

1.1.2 试剂

实验中所用 KOD DNA 聚合酶、PCR 相关 KOD plus 缓冲液、MgSO₄、dNTPs 购自日本 TOYOBO 公司; Fast-Digest 限制性内切酶购自 Fermentas 公司; 辅酶 NADP(H) 以及 NAD(H) 均购自 Codexis 公司; 文中所用底物以及其他试剂均购自 Alfa Aesar 公司。质粒提取试剂盒、核酸回收试剂盒均购自北京全式金生物技术有限公司。实验中所构建质粒均由金唯智生物科技有限公司进行序列测定。

1.1.3 培养基

文中所用培养基均为 LB 培养基, 其中固体培养基中含 1% 琼脂粉。

1.1.4 主要仪器

酶标仪为 MD 公司 Spectramax M2e; 蛋白纯化仪为 ÄKTA purifier 10; 所用层析柱以及填料均购自 GE 公司; APV2000 高压匀浆破碎仪购自 APV 公司; RC6⁺ 高速冷冻离心机购自 Thermo 公司; 离心机为 Eppendorf 公司 5430R; MJ Mini PCR 仪; 核酸、蛋白电泳系统以及 Gel DocTM XR⁺ 凝胶成像系统均购自 Bio-RAD 公司; SS-325 高压灭菌锅购自日本 Tomy Kogyo 公司。

1.2 方法

1.2.1 定点突变

根据 *Stdapdh*^[14] 基因序列和拟突变的位点

设计相应突变引物 (表 2), 所有突变都以含突变前基因的质粒为模板, 按照 QuickChangeTM 试剂盒操作说明进行相应突变。PCR 过程: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退

表 2 突变引物的序列

Table 2 Sequences of mutagenic primers

Mutation	Primer sequence (5'-3')
Y76W	
5'-Primer	TTCTGTTCCGGAATGGGCGGAAGCGAT
3'-Primer	ATCGCTTCCGCCATTCGGAACAGAA
Y76F	
5'-Primer	TTCTGTTCCGGAATTGCGGAAGCGAT
3'-Primer	ATCGCTTCCGCAAATTCGGAACAGAA
Y76E	
5'-Primer	TTCTGTTCCGGAAGAAGCGGAAGCGAT
3'-Primer	ATCGCTTCCGCTTCTTCGGAACAGAA
Y76H	
5'-Primer	TTCTGTTCCGGAACATGCGGAAGCGAT
3'-Primer	ATCGCTTCCGCATGTTCCGGAACAGAA
Y76R	
5'-Primer	TTCTGTTCCGAAAGAGCGGAAGCGAT
3'-Primer	ATCGCTTCCGCTCTTTCGGAACAGAA
Y76M	
5'-Primer	TTCTGTTCCGAAATGGGCGGAAGCGAT
3'-Primer	ATCGCTTCCGCCATTCGGAACAGAA
Y76V	
5'-Primer	TTCTGTTCCGGAAGTCGCGGAAGCGAT
3'-Primer	ATCGCTTCCGCCAGTTCGGAACAGAA
Y76I	
5'-Primer	TTCTGTTCCGGAAGTTCGCGGAAGCGAT
3'-Primer	ATCGCTTCCGCGAGTTCGGAACAGAA
R35S/R36V	
5'-Primer	TGGTGTGTTAGCGTGAAAGTTCTGG
3'-Primer	CCAGAACTTTTCACGCTAACAAACACCA

火 30 s, 68 °C 延伸 7 min, 其中第二步至第四步循环 20 次, 之后于 68 °C 延伸 20 min。PCR 产物进行电泳确证。对扩增出来的目的片段进行切胶回收后, 使用 *Dpn* I 于 30 °C 消化 2 h, 将消化产物转化至大肠杆菌 Top10 感受态细胞中, 涂布至含氨苄青霉素的 LB 固体培养基上进行过夜培养, 挑取单菌落接种至 3 mL 液体 LB 培养基中, 菌体长出后离心取菌体提取质粒, 并将质粒测序验证, 将序列正确的质粒转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态中, 进行后续表达纯化工作。

1.2.2 突变酶的表达纯化

突变酶的表达、纯化方法和野生型酶类似^[14], 首先将含过夜培养的种子液以 1% 的比例接种至 2 000 mL 含 100 µg/mL 氨苄青霉素的液体 LB 培养基中, 于 37 °C、200 r/min 培养至 OD_{600} 约 1.0 后, 加入诱导剂异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 0.5 mmol/L, 25 °C、200 r/min 继续诱导 12 h, 4 °C、5 000 r/min 离心 30 min 收集菌体, 菌体用缓冲液 A (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 500 mmol/L NaCl, 5% 甘油) 重悬, 高压匀浆破碎, 破碎液于 4 °C、14 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液作为粗酶液, 经过 0.22 µm 滤膜过滤后进行镍柱亲和层析。镍柱按照说明书进行再生处理并用缓冲液 A 进行平衡, 上样后先用缓冲液 A 将 A_{280} 紫外吸收洗至基线, 再用 15% 比例的缓冲液 B (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 500 mmol/L NaCl, 5% 甘油, 500 mmol/L 咪唑) 洗脱杂蛋白, 接着使用 50% 比例的缓冲液 B 洗脱目的蛋白, 收集合并洗脱峰, 使用 Amicon Ultra-15 超滤管 (截留分子量: 10 kDa) 进行超滤浓缩, 置换缓冲液至缓冲液 C (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 50 mmol/L NaCl) 并进一步

浓缩, 浓缩后的酶用于 SDS-PAGE 以及酶学性质检测。蛋白质浓度使用 BCA 试剂盒检测, 使用牛血清白蛋白 BSA 作为标准蛋白。

1.2.3 活力测定和动力学参数测定

酶活测定方法参见文献[14], 以 StDAPDH 的天然底物内消旋-二氨基庚二酸 (*meso*-DAP) 为底物, 以 NAD(P)⁺ 为辅酶, 通过检测 A_{340} 下辅酶 NAD(P)H 生成时吸光值的变化来表征突变体的活性, 辅酶的摩尔吸光系数为 6.22 mmol/(L·cm)。酶活测定体系为: 10 mmol/L *meso*-DAP, 0.5 mmol/L NAD(P)⁺, 200 mmol/L Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 10.0, 总体积为 200 µL。酶活单位 (U) 定义为 30 °C 下每分钟生成 1 µmol NAD(P)H 所需要的酶量。

对辅酶动力学参数的测定, 具体条件如下: 100 mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液 (pH 10), 10 mmol/L *meso*-DAP, NADP⁺ 终浓度在 0.031–16 mmol/L 之间变动, NAD⁺ 终浓度在 0.031–32 mmol/L 之间变动。每个 NADP⁺ 浓度做 3–4 次平行反应取平均值, 利用 GraphPad Prism 软件, 根据 Michaelis-Menten 方程式计算野生型酶和各突变体酶对 NADP⁺ 以及 NAD⁺ 的表观 K_m 和 V_{max} 值。

2 结果与分析

2.1 突变位点的选择及突变设计

从 StDAPDH 结合辅酶的结构^[16]可知, 和磷酸基团有直接作用的残基为 R35 和 R36, Y76 的位置类似于铁氧化还原蛋白 NADP⁺ 还原酶中靠近 Y258 的位置^[31-32], StDAPDH 结构中这 3 个位置的氨基酸残基和辅酶的位置关系见图 2。与 NADP⁺ 的腺嘌呤环相临近的 76 位酪氨酸, 其空间位阻较大, 且有极性的羟基; 为了探索其

对辅酶专一性是否有影响, 以及是空间位阻还是极性对辅酶专一性产生影响, 进行了突变改造, 将其突变为和其有类似大位阻的色氨酸 (W)、苯丙氨酸 (F) 和略小位阻的疏水性氨基酸缬氨酸 (V)、甲硫氨酸 (M) 以及异亮氨酸 (I) 以探索空间位阻的影响, 突变为亲水氨基酸如碱性的精氨酸 (R)、酸性的谷氨酸 (E) 及组氨酸 (H) 以探索极性的影响。Lerchner 等改造醇脱氢酶 RasADH 的辅酶偏好性从 NADP^+ 至 NAD^+ 的工作中^[25], 起始酶与辅酶 NADP^+ 上磷酸基团相互作用的氨基酸残基也是两个精氨酸 (R38 及 R39), 通过将它们突变为 R38V/R39S 后成功将辅酶偏好性改为 NAD^+ 依赖型。通过结构比较可以发现, StDAPDH 中的 R35 及 R36 分别对应 RasADH 中的 R39 和 R38。对 StDAPDH 设计了 R35S/R36V 双突变, 探索该双突变是否和 RasADH 中一样能使辅酶偏好性发生翻转。突变引物序列见表 2。

2.2 突变体的纯化以及性质分析

我们首先对构建的 Y76 单突变进行了表达纯化, 利用纯酶对两种辅酶活力进行了测定

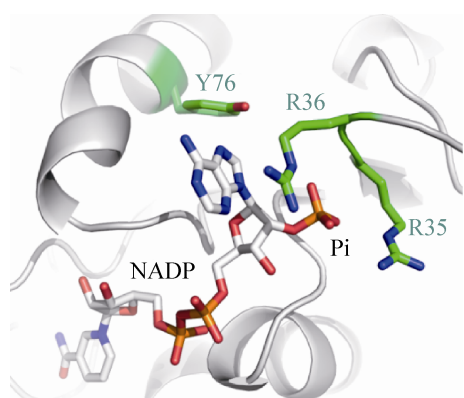


图 2 StDAPDH 中和辅酶偏好性可能相关的位点
Fig. 2 The residues that might affect the co-enzyme specificity of StDAPDH.

及比较, 单突变的纯酶结果见图 3, 其与野生型对两种辅酶的比活力比较见图 4。

通过对 Y76 位的不同单突变对两种辅酶比活力的比较 (图 4), 我们可以看出, 除 Y76W 外的所有突变子对 NAD^+ 的比活力均有所提高, 而且所有 Y76 位突变子对 NADP^+ 的比活力均有所下降。在这些突变子中, 位阻最大的 Y76W 对两种辅酶的比活力为 Y76 位单突变中最低的, 可能是因为其较大的位阻影响了 NAD(P)^+ 上腺嘌呤的结合, 因而影响它们的活力。突变后位阻比酪氨酸略小的疏水氨基酸 Y76F 对辅酶活力变化趋势和野生型酶影响趋势最为接近, 其对 NAD^+ 的比活力相比较野生型酶有所提高, 其对 NADP^+ 的比活力是所有突变子中最高的; 酸性氨基酸 Y76E 对 NAD^+ 的活力比 Y76F 有进一步提高, 碱性氨基酸 Y76H 比 Y76E 对 NAD^+ 的活力更高, 但对 NADP^+ 的活力略低; 同为碱性的氨基酸 Y76R 比 Y76H 对 NAD^+ 的活力则更高一些, 对 NADP^+ 的活力也相对更高; 位阻更小的疏水性的 Y76M、Y76V 以及 Y76I 对 NAD^+ 的活力逐步增高, 对 NADP^+ 的活力也相应逐步降低, 表明它们的辅酶偏好性偏转能力也逐步提高; 在我们测试的这些 Y76 突变子中, Y76V 及 Y76I 对 NAD^+ 的比活力最高。在所有 Y76 的突变子中, 虽然 Y76E 有最高的 $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ 比值 (0.73), 但其对 NAD^+ 的活力并不是最高; 而 Y76I 突变子, 虽然 $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ 比值为 0.69, 但其对 NAD^+ 活力是 Y76 突变子中最高的。

为考察 R35/R36 为对辅酶偏好性的影响, 我们借鉴别人的结果, 进行了 R35S/R36V 双突变; 为考察 Y76 位的突变和 R35、R36 位突变是否有相互作用, 我们选取了 Y76 单突变中对

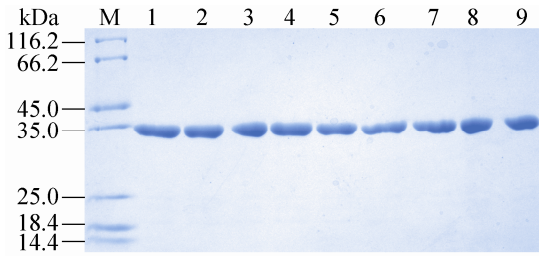


图3 StDAPDH Y76单突变纯酶的SDS-PAGE结果
Fig. 3 SDS-PAGE of purified Y76 single mutants. M: protein molecular weight marker; 1: wild-type StDAPDH; 2: Y76W; 3: Y76F; 4: Y76E; 5: Y76H; 6: Y76R; 7: Y76M; 8: Y76V; 9: Y76I.

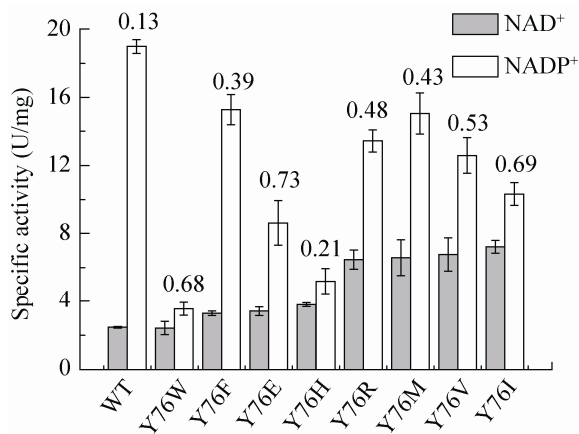


图4 野生型和Y76单突变酶的比活力
Fig. 4 Specific activity of wild-type and Y76 single mutants. The specific activity for NAD⁺ are in light gray, the specific activity for NADP⁺ are in dark gray. The value above bar diagram represents the ratio of NAD⁺ to NADP⁺.

NADP⁺活力最高的Y76F, 对NAD⁺活力最高的Y76V和Y76I, 分别与R35S/R36V进行了组合突变, 并进行了表达、纯化及活力测定。纯化结果见图5。

R35S/R36V双突变对StDAPDH辅酶偏好性影响和Y76W单突变类似, 对两个辅酶的活力都有明显降低, 而且对NAD⁺的比活力仍然低于对NADP⁺的比活力(图6)。对R35、R36两

个位点的突变结果表明, 尝试改造的R35S/R36V虽然确实对酶的偏好性有影响, 其NAD⁺/NADP⁺比值(1.25)比所有Y76单突变(最高值为0.73)都高, 但是对NAD⁺活力提高不明显。R35S/R36V双突变和Y76F组合后的

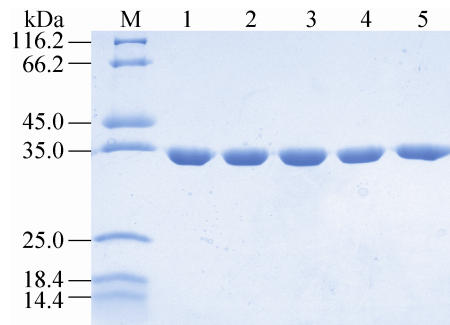


图5 R35S/R36V以及三突变纯酶的SDS-PAGE结果

Fig. 5 SDS-PAGE of purified R35S/R36V and triple mutants. M: protein molecular weight marker; 1: wild-type StDAPDH; 2: R35S/R36V; 3: R35S/R36V/Y76F; 4: R35S/R36V/Y76I; 5: R35S/R36V/Y76V.

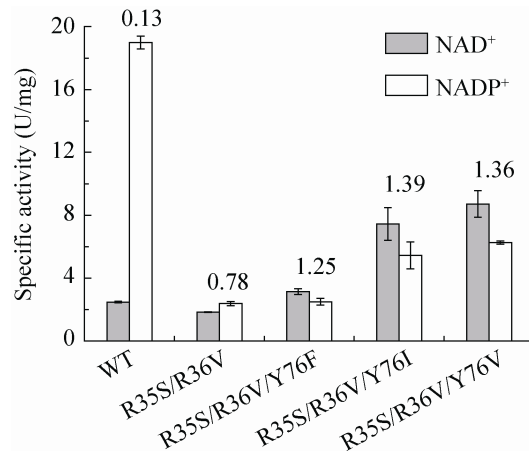


图6 野生型和突变体酶的比活力

Fig. 6 Specific activity of wild-type and mutants. The specific activity for NAD⁺ of mutants is in light gray, the specific activity for NADP⁺ of mutants are in black. The values above bar diagram represent the ratio of NAD⁺ to NADP⁺.

R35S/R36V/Y76F 对辅酶 NAD^+ 的比活力相比 Y76F 单突变没有明显变化, 但 $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ 比值却从 0.39 提高到 1.25, 而且该突变对 NAD^+ 的比活力高于对 NADP^+ 的比活力; R35S/R36V 和 Y76I 及 Y76V 组合后的突变子对 NAD^+ 的比活力也均高于它们对 NADP^+ 的比活力, 而且它们的 $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ 比值也均有明显提高, 分别从 0.69 到 1.39, 以及 0.53 到 1.36; 在单突变中 Y76I 比 Y76V 对 NAD^+ 的比活力稍高, 但在组合的三突变中, R35S/R36V/Y76V 却比 R35S/R36V/Y76I 对 NAD^+ 的比活力更高。这些结果表明, R35/R36 位和 Y76 位组合后, 可以获得比单独进行单突变或双突变更好的结果, 但其所起的作用并不是简单的叠加。后续若想获得更好结果, 可能需要先筛选出 R35/R36 位较好的结果, 并将较好的双突变结果和 76 位进行进一步组合突变并进行筛选。

本研究中涉及的突变子动力学参数测定结果见表 3。从表中可以看出, 所有 Y76 突变对 NAD^+ 的 K_m 都降低了, 而且除了 Y76E 外所有突变对 NADP^+ 的 K_m 也降低了, 其中对 NADP^+ 的 K_m 值最小的是 Y76F, 这说明 Y76F 对 NADP^+ 的亲合力最好; Y76E 对 NADP^+ 的 k_{cat} 最高, 但同时其 K_m 也最高, 这说明 Y76E 在提高了其催化效率的同时也降低了对 NADP^+ 的亲合力; 对 NAD^+ 的 K_m 值最小的是空间位阻较小的 Y76M、Y76I 和 Y76V, Y76V 对 NAD^+ 的 k_{cat} 和 k_{cat}/K_m 是所有突变中最大的, 这说明在对 NAD^+ 的亲合力和催化效率中, 空间位阻起到了重要的作用。

从表 3 中还可以看出, R35S/R36V 对 NADP^+ 和 NAD^+ 的 K_m 、 k_{cat} 以及 k_{cat}/K_m 都降低了, 这说明与磷酸基团有相互作用的 R35、R36 对辅酶亲

和力和催化效率有非常重要的作用。同时, 还可以看出 Y76 对 R35S/R36V 的作用与 Y76 的单突变的效果一致, 当 Y76 的空间位阻依次变小 (F、I、V) 时, 其对 NAD^+ 的 K_m 也变小; 通过比较单突变 Y76V, Y76I 和三突变 R35S/R36V/Y76V 和 R35S/R36V/Y76I 对 NAD^+ 的 k_{cat}/K_m 时可以发现, 它们之间存在协同作用: Y76V 的 k_{cat}/K_m 比 Y76I 大, 但 R35S/R36V/Y76V 的 k_{cat}/K_m 却比 R35S/R36V/Y76I 的数值小, 这可能是因为 Y76V 和 R35S/R36V 都突变为位阻较小的氨基酸残基, 表 3 中 $K_m(\text{NAD}^+)/K_m(\text{NADP}^+)$ 值显示, Y76 突变对 NAD^+ 和 NADP^+ 亲合力差异的贡献各不相同, 与野生型相比, 空间位阻相对较小的 M、V 和 I 对辅酶的亲合力更偏好于 NAD^+ , 其中 Y76I 的 $K_m(\text{NAD}^+)/K_m(\text{NADP}^+)$ 值比野生型的低了 6 倍多, 显示其对 NAD^+ 的亲合力有明显的提高。双突变 R35S/R36V 与野生酶相比, $K_m(\text{NAD}^+)/K_m(\text{NADP}^+)$ 值相差 23 倍, 在此基础上, 增加额外的一个突变 (无论是 Y76I, F 或者 V) 都导致此效果的进一步提升。表 3 中 $k_{\text{cat}}(\text{NAD}^+)/k_{\text{cat}}(\text{NADP}^+)$ 的结果显示, 与野生酶相比, 大部分突变都导致了酶对 NAD^+ 和 NADP^+ 的 k_{cat} 差异的变化, 其中以 Y76R 和 Y76V 导致酶选择 NAD^+ 作为辅因子最有效, 3 个突变中, R35S/R36V/Y76I 最高。

以上结果分析可知, R35、R36 对 NAD^+ 和 NADP^+ 偏好性的选择具有关键的作用, 这可能是其直接与磷酸基团相互作用的结果。不仅如此, Y76 对 NAD^+ 和 NADP^+ 的偏好性选择也有重要的作用, 可能通过对嘌呤环的作用, 改变了 NAD^+ 在酶结构中的构象, 使 NAD^+ 更好地与酶结合, 导致催化效率的提高。

表 3 野生型 StDAPDH 和所有突变子的动力学参数

Table 3 Kinetic parameters of wild-type StDAPDH and its mutants

	NADP ⁺			NAD ⁺			K_m	k_{cat}
	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mmol/L}^{-1}\text{s}^{-1}$)	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mmol/L}^{-1}\text{s}^{-1}$)	(NAD ⁺)/ K_m (NADP ⁺)	(NAD ⁺)/ k_{cat} (NADP ⁺)
Wild-type	93.0±4.8	24.4±0.1	261.4	5 490±534	33.6±1.3	6.1	59.0	1.4
Y76W	63.0±7.0	15.0±0.8	238.6	4 005±621	18.6±1.0	4.6	63.5	1.2
Y76F	28.0±4.2	11.5±0.6	407.5	2 587±203	24.2±0.6	9.3	92.3	2.1
Y76E	112.0±7.5	53.1±1.0	474.1	3 478±156	55.4±0.9	15.9	31.0	1.0
Y76H	40.0±5.4	10.6±0.5	260.7	3 949±411	25.9±1.2	6.5	98.7	2.4
Y76R	56.0±9.9	10.9±0.7	193.5	1 882±363	63.3±4.8	33.6	33.6	5.8
Y76M	43.0±5.8	13.2±0.6	301.6	648.6±63.0	42.1±1.7	65.0	15.0	3.2
Y76V	43.0±4.5	10.3±0.3	240.6	978.5±39.0	70.2±0.8	71.7	22.7	6.8
Y76I	71.0±17.0	13.5±1.6	189.5	662.2±48.0	16.5±0.4	24.9	9.3	1.2
R35S/R36V	4 544±251	16.5±0.4	3.63	11 520±1336	45.1±2.8	3.9	2.5	2.7
R35S/R36V/Y76F	5 745±329	24.0±0.9	4.18	7 309±1103	21.1±1.3	2.8	1.2	0.9
R35S/R36V/Y76V	1 258±97	10.6±0.3	8.46	2 042±154	13.6±0.3	6.6	1.6	1.3
R35S/R36V/Y76I	490±68	9.7±0.3	19.8	613.7±71.0	16.6±0.6	27.1	1.2	1.7

3 讨论

从上述结果中可以发现, 虽然 Y76 单突变对 NAD⁺ 的比活仍低于对 NADP⁺ 的比活, 但该位点的突变对辅酶偏好性确有影响, 动力学数据结果表明, Y76 位的突变是通过改变酶和辅酶 NADP⁺ 和 NAD⁺ 的亲合力来影响其辅酶专一性的。对与 NADP⁺ 磷酸基团有直接作用的 R35/R36 设计的 R35S/R36V 突变, 虽然改变了辅酶偏好性, 但对 NAD⁺ 的比活力没有明显提升; 而测试的 Y76 突变和 R35S/R36V 突变组合, 对辅酶偏好性有影响的同时, 对 NAD⁺ 的比活力均已大于对 NADP⁺ 的比活力。这些结果表明, 距离腺嘌呤较近的 Y76 对 StDAPDH 的辅酶偏好性确有影响, 而且该位置和与 NADP⁺ 上磷酸

有直接作用的 R35 及 R36 对辅酶偏好性有协同作用。

在本文进行的改造尝试基础上, 对 StDAPDH 的 R35、R36 及 Y76 进行组合饱和突变, 也许能获得对 NAD⁺ 活力更高的突变酶, 相关研究工作正在进行中。

REFERENCES

- [1] Yonaha K, Soda K. Applications of stereoselectivity of enzymes: synthesis of optically active amino acids and alpha-hydroxy acids, and stereospecific isotope labeling of amino acids, amines and coenzymes. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 1986, 33: 95–130.
- [2] Tanigawa M, Shinohara T, Saito M, et al. D-Amino acid dehydrogenase from *Helicobacter pylori*

- NCTC 11637. *Amino Acids*, 2010, 38(1): 247–255.
- [3] Xu SJ, Ju JS, Ma YH. Identification and expression a D-amino acid dehydrogenase gene from *Pseudomonas fluorescens* TM5-2. *Acta Microbiol Sin*, 2007, 47(4): 634–638 (in Chinese).
徐书景, 鞠建松, 马延和. 荧光假单胞菌 TM5-2 中 D-型氨基酸脱氢酶的鉴定和表达. *微生物学报*, 2007, 47(4): 634–638.
- [4] Jones H, Venables WA. Solubilisation of D-amino acid dehydrogenase of *Escherichia coli* K12 and its re-binding to envelope preparations. *Biochimie*, 1983, 65(3): 177–183.
- [5] Jones H, Venables WA. Effects of solubilisation on some properties of the membrane-bound respiratory enzyme D-amino acid dehydrogenase of *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, 1983, 151(2): 189–192.
- [6] Wild J, Obrepalska B. Regulation of expression of the *dadA* gene encoding D-amino acid dehydrogenase in *Escherichia coli*: analysis of *dadA-lac* fusions and direction of *dadA* transcription. *Mol Gen Genet*, 1982, 186(3): 405–410.
- [7] Wild J, Klopotoski T. D-amino acid dehydrogenase of *Escherichia coli* K12: positive selection of mutants defective in enzyme activity and localization of the structural gene. *Mol Gen Genet*, 1981, 181(3): 373–378.
- [8] Olsiewski PJ, Kaczorowski GJ, Walsh C. Purification and properties of D-amino acid dehydrogenase, an inducible membrane-bound iron sulfur flavoenzyme from *Escherichia coli* B. *J Biol Chem*, 1980, 255(10): 4487–4494.
- [9] Misono H, Soda K. Properties of *meso*-alpha, epsilon-diaminopimelate D-dehydrogenase from *Bacillus sphaericus*. *J Biol Chem*, 1980, 255(22): 10599–10605.
- [10] Vedha-Peters K, Gunawardana M, Rozzell JD, et al. Creation of a broad-range and highly stereoselective D-amino acid dehydrogenase for the one-step synthesis of D-amino acids. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(33): 10923–10929.
- [11] Akita H, Doi K, Kawarabayasi Y, et al. Creation of a thermostable NADP(+)-dependent D-amino acid dehydrogenase from *Ureibacillus thermosphaericus* strain A1 *meso*-diaminopimelate dehydrogenase by site-directed mutagenesis. *Biotechnol Lett*, 2012, 34(9): 1693–1699.
- [12] Akita H, Suzuki H, Doi K, et al. Efficient synthesis of D-branched-chain amino acids and their labeled compounds with stable isotopes using D-amino acid dehydrogenase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(3): 1135–1143.
- [13] Misono H, Togawa H, Yamamoto T, et al. *Meso*-alpha, epsilon-diaminopimelate D-dehydrogenase: distribution and the reaction product. *J Bacteriol*, 1979, 137(1): 22–27.
- [14] Gao X, Chen X, Liu W, et al. A novel *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Symbiobacterium thermophilum*: overexpression, characterization, and potential for D-amino acid synthesis. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(24): 8595–8600.
- [15] Gao X, Huang F, Feng J, et al. Engineering the *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Symbiobacterium thermophilum* by site-saturation mutagenesis for D-phenylalanine synthesis. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(16): 5078–5081.
- [16] Liu W, Li Z, Huang CH, et al. Structural and mutational studies on the unusual substrate specificity of *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Symbiobacterium thermophilum*. *Chem Biochem*, 2014, 15(2): 217–222.
- [17] Weckbecker A, Groger H, Hummel W. Regeneration of nicotinamide coenzymes: principles and applications for the synthesis of chiral compounds. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*,

- 2010, 120: 195–242.
- [18] Banta S, Swanson BA, Wu S, et al. Alteration of the specificity of the cofactor-binding pocket of *Corynebacterium* 2,5-diketo-D-gluconic acid reductase A. *Protein Eng*, 2002, 15(2): 131–140.
- [19] Liang L, Zhang J, Lin Z. Altering coenzyme specificity of *Pichia stipitis* xylose reductase by the semi-rational approach CASTing. *Microb Cell Fact*, 2007, 6: 36.
- [20] Rosell A, Valencia E, Ochoa WF, et al. Complete reversal of coenzyme specificity by concerted mutation of three consecutive residues in alcohol dehydrogenase. *J Biol Chem*, 2003, 278(42): 40573–40580.
- [21] Khoury GA, Fazelinia H, Chin JW, et al. Computational design of *Candida boidinii* xylose reductase for altered cofactor specificity. *Protein Sci*, 2009, 18(10): 2125–2138.
- [22] Cui DB, Zhang LJ, Yao ZQ, et al. Computational design of short-chain dehydrogenase Gox2181 for altered coenzyme specificity. *J Biotechnol*, 2013, 167(4): 386–392.
- [23] Scrutton NS, Berry A, Perham RN. Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature*, 1990, 343(6253): 38–43.
- [24] Cho H, Oliveira MA, Tai HH. Critical residues for the coenzyme specificity of NAD(+)-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys*, 2003, 419(2): 139–146.
- [25] Lerchner A, Jarasch A, Meining W, et al. Crystallographic analysis and structure-guided engineering of NADPH-dependent *Ralstonia* sp alcohol dehydrogenase toward NADH cosubstrate specificity. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(11): 2803–2814.
- [26] Rane MJ, Calvo KC. Reversal of the nucleotide specificity of ketol acid reductoisomerase by site-directed mutagenesis identifies the NADPH binding site. *Arch Biochem Biophys*, 338(1): 83–89.
- [27] Zeng QK, Du HL, Wang JF, et al. Reversal of coenzyme specificity and improvement of catalytic efficiency of *Pichia stipitis* xylose reductase by rational site-directed mutagenesis. *Biotechnol Lett*, 2009, 31(7): 1025–1029.
- [28] Bubner P, Klimacek M, Nidetzky B. Structure guided engineering of the coenzyme specificity of *Pseudomonas fluorescens* mannitol 2-dehydrogenase to enable efficient utilization of NAD(H) and NADP(H). *FEBS Lett*, 2008, 582(2): 233–237.
- [29] Dambe TR, Kuhn AM, Brossette T, et al. Crystal structure of NADP(H)-dependent 1,5-anhydro-D-fructose reductase from *Sinorhizobium morelense* at 2.2 Å resolution: construction of a NADH-accepting mutant and its application in rare sugar synthesis. *Biochemistry*, 2006, 45(33): 10030–10042.
- [30] Shiraishi N, Croy C, Kaur J, Campbell WH. Engineering of pyridine nucleotide specificity of nitrate reductase: mutagenesis of recombinant cytochrome b reductase fragment of *Neurospora crassa* NADPH: nitrate reductase. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 358(1): 104–115.
- [31] Crobu D, Canevari G, Milani M, et al. *Plasmodium falciparum* ferredoxin-NADP⁺ reductase His286 plays a dual role in NADP(H) binding and catalysis. *Biochemistry*, 2009, 48(40): 9525–9533.
- [32] Baroni S, Pandini V, Vanoni MA, et al. A single tyrosine hydroxyl group almost entirely controls the NADPH specificity of *Plasmodium falciparum* ferredoxin-NADP⁺ reductase. *Biochemistry*, 2012, 51(18): 3819–3826.

(本文责编 陈宏宇)