

Val22 对恶臭假单胞菌扁桃酸消旋酶催化活性的影响

梅卓航 刘击 于洪巍*

(浙江大学 生物工程研究所 浙江 杭州 310027)

摘要: 恶臭假单胞菌扁桃酸消旋酶的 Val22 位于 20s 环状结构上, 是与底物结合相关的氨基酸之一。其中 Val 被替换为 Arg 后酶活性下降了 75.9%。除了酶与底物疏水作用减弱以外, 静电排斥作用增强也可能引起活性的下降。利用分子动力学模拟对酶与底物的米氏复合物进行分析, 结果表明: 突变后第 22 位氨基酸侧链与底物的静电势从 0.036 kJ/mol 升高至 0.124 kJ/mol。这说明氨基酸侧链极性的改变增加了侧链与底物分子之间的静电排斥作用, 因而静电排斥作用也是导致突变体活性下降的原因之一。同时, 突变后系统势能增加了 283 kJ/mol, 进一步证实了第 22 位氨基酸侧链极性和带电性质的改变导致酶与底物结合状态的势能增大, 从而引起活性大幅下降。因此, 将来对酶的结合口袋区域进行理性设计时, 除了考虑空间位阻效应外, 还需考虑疏水作用和静电作用。

关键词: 扁桃酸消旋酶, 恶臭假单胞菌, 定点突变, 分子动力学

The effect of Val22 on the catalytic activity of mandelate racemase from *Pseudomonas putida*

MEI Zhuo-Hang LIU Ji YU Hong-Wei*

(Institute of Bioengineering, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310027, China)

Abstract: Located in the 20s loop of mandelate racemase from *Pseudomonas putida*, Val22 is one of the amino acids related with substrate binding. In this study, a 75.9% decrease of activity was observed after Val was substituted by Arg. In addition to the reduction of hydrophobic interaction between enzyme and substrate, electrostatic repulsion could also lead to the decrease of activity. Molecular dynamic was utilized and showed that the electrostatic potential of substrate and amino acid of No. 22 increased from 0.036 kJ/mol to 0.124 kJ/mol. This result indicated that the increased activity in the mutant was mainly attributed to the shift of side chain polarity and the electrostatic repulsion between side chain and substrate. An increase of 283 kJ/mol in the potential energy of system suggested that the

changes of side chain polarity and electric property brought about the increase of potential energy in binding state and the dramatical decline of activity. Therefore hydrophobic interaction and electrostatic interaction should be considered with steric bulk when rationally designing the binding pocket of mandelate racemase.

Keywords: Mandelate racemase, *Pseudomonas putida*, Site-directed mutagenesis, Molecular dynamic

扁桃酸消旋酶(Mandelate racemase, MR) (EC 5.1.1.2)能在 Mg^{2+} 辅助下催化1,1-质子转移反应,使扁桃酸等手性化合物的一个对映体转化为另一个对映体^[1]。通过与其他具有手性选择性的酶偶联,MR能够对外消旋体进行动态动力学拆分以获得光学纯手性化合物,并将理论转化率从50%提高至100%,增加了反应效率^[2]。然而,消旋酶的活性不高,难以实现工业化应用。因此,为提高该酶的催化活性,定点突变等手段被应用到该酶的活性改造中。然而由于酶结构与对应功能的研究尚未深入,至今仍未有突变体活性提高的报道。在各种消旋酶中,恶臭假单胞菌中的扁桃酸消旋酶应用最为广泛。它的晶体结构已得到解析^[3],催化机理也已得到明确的阐述^[4-5],并作为催化模型被用于高 pK_a 的羧酸类底物去质子化反应的研究。这为通过理性设计提高扁桃酸消旋酶活性提供了所需的信息。

如图 1 所示,底物通过 Mg^{2+} 的静电作用,并与第 164 位的赖氨酸,第 317 位的谷氨酸,第 197 位的天冬酰胺形成氢键以定位在活性中心,由第 166 位的赖氨酸和第 297 位的组氨酸催化完成质子转移反应^[6-7]。研究表明,以上这些氨基酸的突变将会导致

催化活性部分或者完全丧失^[8-9]。因此对该酶的分子改造更加集中在位于底物疏水端附近的位点。

在这些氨基酸中,第 22 位氨基酸位于 *R* 构型底物分子的结合口袋中。它与 *R* 构型底物分子的苯基相邻,是两者形成米氏复合物的一个重要氨基酸。因此该位点的突变应对酶活性产生较大的影响。Bearn 等对该位点进行定点突变的研究表明,将 Val22 替换为空间位阻较大的异亮氨酸和苯丙氨酸后活性并没有显著下降^[10],因而认为该位点氨基酸重要性不高。本研究将报道一个 Val 被替换为 Arg 的突变体 V22R,其催化活性大幅下降。此外,为进一步研究引起活性下降的原因,我们通过分子动力学模拟分析突变前后静电势和体系势能的变化,以期对该位点的功能进行探索,为该酶的理性设计和结构改造奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

菌株 *Pseudomonas putida* (ATCC12633)购于美国标准菌种收藏所。表达质粒 pET-30a 和大肠杆菌 BL21(DE3),大肠杆菌 DH5 α 均为本实验室保藏。

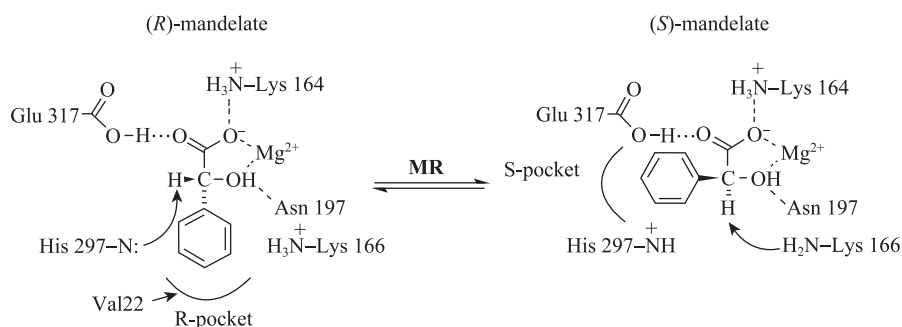


图 1 扁桃酸消旋酶催化扁桃酸消旋反应的示意图

Fig. 1 Racemization of mandelate catalyzed by MR

1.2 酶与试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶购自 Promega; DNA marker、高保真聚合酶 PrimeStar 购自大连宝生物公司; PCR 纯化试剂盒及质粒纯化试剂盒购自 Axygen 公司; (*R*)-和(*S*)-扁桃酸为阿拉丁公司产品; 其它试剂为国产化学纯或分析纯药品。

1.3 实验方法

1.3.1 扁桃酸消旋酶基因的克隆与重组载体的构建:

根据恶臭假单胞菌中扁桃酸消旋酶基因序列 (*mdla*), 设计上下游扩增引物及酶切位点 *EcoR* I / *Xho* I (斜体部分为酶切位点)。

引物 1: 5'-*GGAATTC*ATGAGTGAAGTACTGAT TACCG-3';

引物 2: 5'-*CCGCTCGAGTTACACCAGATATTT* CCCGATTT-3'。

以恶臭假单胞菌基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增: 94 °C 3 min; 98 °C 1 min, 52 °C 90 s, 72 °C 80 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物纯化后与 pET30a 载体分别进行双酶切, 割胶纯化。将目的基因与载体连接后转化入大肠杆菌 BL21(DE3) 中。对酶切鉴定正确的阳性克隆进行测序。

1.3.2 扁桃酸消旋酶突变体 V22R 的构建:

根据文献[11]所报道的定点突变策略设计引物(下划线部分为突变位点, 由 GTT 变为 CGT)。

引物 3: 5'-TCCAACAGCGGTGTGACGGGGG TAGGCCAATGGGACATTGA-3';

引物 4: 5'-CCCATTGGCCTACCCCCGTACACA CCGCTGTTGGAAGTGTG-3'。

为保证模板质粒能被 *Dpn* I 消化, 将克隆得到的重组质粒 pET30a-MR 从大肠杆菌 BL21(DE3) 中提取出来, 转化到大肠杆菌 DH5 α 中使其甲基化。以该质粒为模板进行 PCR 扩增, 退火温度 57 °C, 其余条件参照高保真酶 PrimeStar 说明书。扩增后用琼脂糖凝胶电泳分析。将 PCR 产物用 *Dpn*I 消化 3 h 后转化到大肠杆菌 BL21(DE3) 中。挑取阳性克隆进行测序。

1.3.3 扁桃酸消旋酶及其突变体的表达与纯化:

分别将 MR 和 V22R 的重组菌接种到含卡那霉

素 10 mg/L 的 LB 培养基中, 在 37 °C 振荡培养至 $OD_{600} \approx 0.6$, 加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 37 °C 振荡培养 4 h; 离心收集菌体后重悬于 50 mmol Tris-HCl (pH 8.1) 缓冲液中, 超声波破碎。细胞破碎液离心 20 min, 上清液即为粗酶液。经 Ni²⁺亲和层析柱(HisTrap HP, 5 mL)纯化, 收集目的峰。用 10% 的凝胶进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测目的蛋白。

1.3.4 扁桃酸消旋酶及其突变体的活性测定:

在 1 mL 水相体系中加入 100 μ L (*R*)-扁桃酸(0.08 g/mL), 50 μ L 酶液, 100 μ L Tris-HCl (1 mol/L, pH 7.5) 缓冲液, 20 μ L MgCl₂ (0.2 mol/L), 25 °C 反应 30 min。扁桃酸对映体含量用 HPLC 检测, 色谱柱型号为 CHIRALPAK AD-H 手性柱, 流动相为异丙醇和正己烷(10:90, *V/V*), 流速为 1 mL/min, 在 254 nm 处进行紫外检测。在室温下, (*S*)-扁桃酸的保留时间为 12 min, (*R*)-扁桃酸的保留时间约为 14.5 min。扁桃酸消旋酶的酶活力定义为: 在上述反应条件下每分钟转化(*R*)-扁桃酸生成 1 μ mol (*S*)-扁桃酸所需要的酶量定义为 1 个酶活单位。用 Bradford 法测定其蛋白浓度。

1.3.5 分子动力学模拟:

扁桃酸消旋酶三级结构信息(登录号 1MDR)来源于 Protein Data Bank。突变体结构通过 Swiss-model^[12]建模。用 Chimera^[13]进行结构显示, 并根据 PDB 中抑制物的结合位点确定 (*R*)-扁桃酸的结合位置。用 Gromacs 软件包^[14]在 gromos96 53a6 力场^[15]下进行分子动力学模拟。体系组成如表 1 所示, 温度 300 K, NPT 系综, 范德华截断半径与 PME 截断半径均为 1.4 nm。采用 500 步最陡下降法、500 步共轭梯度法进行能量最小化, 500 ps 限制性模拟, 2 ns 预稳定和 8 ns 完全模拟。利用 Gromacs 自带程序 *g_rms* 计算蛋白质骨架的 RMSD (Root mean square deviation) 变化趋势, 确定

表 1 分子动力学模拟体系组成				
Table 1 Composition of molecular dynamic system				
	H ₂ O	Na ⁺	Enzyme	(<i>R</i>)-mandelate acid
MR	15 337	5	1	1
V22R	15 337	4	1	1

体系平衡之后, 由 Gromacs 自带程序 *g_energy* 用 8 ns 完全模拟的数据计算体系势能。

2 结果与讨论

2.1 MR 基因的克隆与突变体 V22R 的构建

以提取的恶臭假单胞菌基因组 DNA 为模板, 对 MR 基因进行 PCR 扩增。在退火温度为 52 °C 时扩增得到约 1 100 bp 的特异性条带, 如图 2 所示。用 *EcoR* I/*Xho* I 分别对 PCR 产物和 pET-30a 进行双酶切。酶切产物割胶纯化之后连接得到 pET30-MR 重组质粒。在转化进大肠杆菌 BL21(DE3)后, 提取质粒并用 *EcoR* I/*Xho* I 进行酶切验证, 结果如图 3 所示。测序结果显示序列完全正确。

将重组质粒转入大肠杆菌 DH5 α 中使其甲基化。以甲基化后的质粒为模板, 用部分互补的两条引物(引物 3 和引物 4)对整个重组质粒进行 PCR 扩增。PCR 产物的电泳结果如图 4 所示。经测序验证, 所挑取的阳性克隆只在目标位置发生了预定的突变。

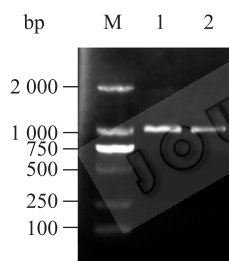


图 2 MR 基因 PCR 产物的电泳分析

Fig. 2 Electrophoretic analysis of PCR product of MR gene

Note: M: DNA marker; 1,2: PCR product of MR gene.

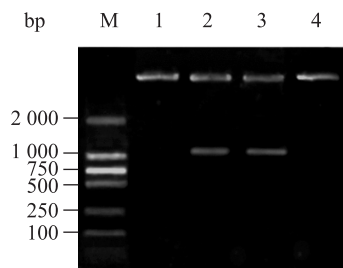


图 3 阳性转化子酶切产物电泳分析

Fig. 3 Electrophoretic analysis of restriction digestion

Note: M: DNA marker; 1,4: Product of restriction digestion without target gene; 2,3: Product of restriction digestion with target gene.

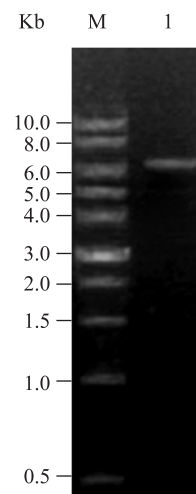


图 4 定点突变 PCR 产物的电泳分析

Fig. 4 Electrophoretic analysis of PCR product of site-directed mutagenesis

Note: M: DNA marker; 1: PCR product of pET30-MR after site-directed mutagenesis.

2.2 MR 与 V22R 的表达、纯化和活性测定

利用重组质粒中的 His-tag 对野生型和突变后的 MR 粗酶液用 Ni²⁺亲和层析柱纯化。在高浓度咪唑溶液的洗脱下得到高纯度的目标蛋白, 如图 5 所示。纯化后, 得到的野生型酶液浓度为 4.80 g/L, 突变体酶液浓度为 0.982 g/L。根据 1.3.4 所述配制反应液进行反应。通过 HPLC 图谱中的峰面积换算反应转化率, 根据底物的起始浓度计算得到野生型比活力为 32.3 U/mg, 突变体 V22R 的比活力为 7.8 U/mg, 相对于野生型降低了 75.9%。

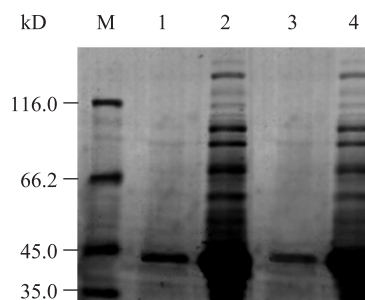


图 5 纯化前后野生型 MR 与突变体 V22R 的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 5 SDS-PAGE of MR and V22R

Note: M: Protein marker; 1: MR after purification; 2: MR crude extracts before purification; 3: V22R after purification; 4: V22R crude extracts before purification.

突变后仅第 22 位氨基酸侧链发生了变化: 空间位阻增大, 从非极性变成了带有正电荷的基团。由于第 22 位氨基酸与底物分子的苯基相邻, 空间位阻、疏水作用和静电作用都可能影响酶的催化活性。现分别从这 3 方面对突变后酶活性下降的原因进行讨论:

1) 研究表明, Val22 位于高度柔性的 20s 环状区域, 其侧链大小的增加会引起环状结构的移动, 而不会使催化活性大幅下降^[10]。因而空间位阻的改变不是引起活性大幅下降的主要原因。

2) 突变后极性基团的引入降低了口袋结构的疏水性, 减弱了它与底物苯环之间的疏水作用力, 从而影响酶与底物的正常结合。因此疏水作用力减弱应是酶催化活性下降的一个主要原因。

3) 由于扁桃酸上的羟基和羧基有较强的吸电子作用, 因此苯环以及 α 碳原子上会带有部分正电荷。如图 6 和图 7 所示, 精氨酸的氨基处于苯环附近, 靠近带有部分正电荷的 α 碳原子而远离带负电荷的氧原子。因此, 尽管扁桃酸分子整体为电负性, 但精氨酸上的正电荷仍可能对底物产生静电排斥作用。为验证这一假设, 我们对 MR 和 V22R 进行了分子动力学模拟。

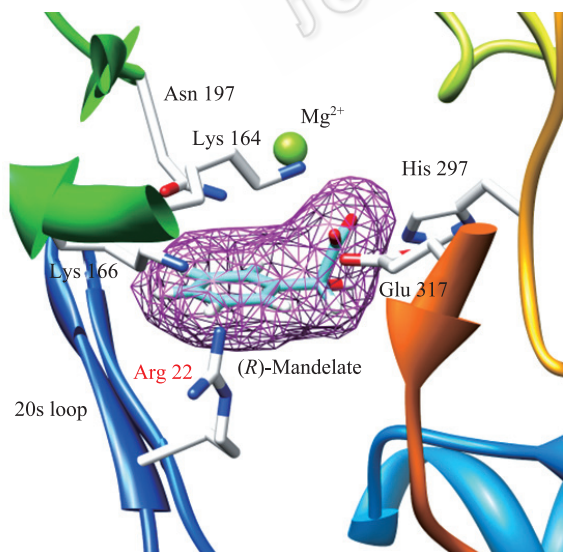


图 6 (*R*)-扁桃酸在扁桃酸消旋酶活性中心处的位置
Fig. 6 (*R*)-mandelate in the activity site of mandelate racemase

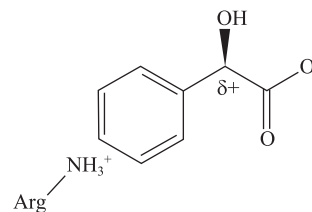


图 7 (*R*)-扁桃酸与精氨酸侧链氨基的相对位置关系
Fig. 7 The relative position of (*R*)-mandelate and the NH_3^+ of Arg22

2.3 MR 与 V22R 的分子动力学模拟

通过分子动力学分别对 MR 和 V22R 与 (*R*)-扁桃酸复合物进行研究, 计算结果表明: Val 与底物之间的静电作用能为 0.036 kJ/mol; Arg 与底物之间的静电作用能为 0.124 kJ/mol, 比前者升高 0.088 kJ/mol。这说明氨基酸侧链极性的改变引起了侧链基团与底物分子之间的静电排斥作用, 使得 V22R 催化活性下降。此外, MR 的系统总势能为 -615 668 kJ/mol, V22R 系统总势能为 -615 385 kJ/mol, 比前者提高了 283 kJ/mol。这一结果进一步证实了 2.2 中关于疏水作用和静电作用对活性产生影响的结论, 即第 22 位氨基酸侧链极性和带电性质的改变导致酶与底物结合状态的势能增大, 不利于米氏复合物的形成以及后续催化反应的进行, 从而引起活性的大幅下降。

之前的文献报道了位于扁桃酸消旋酶 *S* 口袋结构中 2 个关键位点(第 52 位和 54 位)的侧链空间位阻对活性有重要影响^[4]。然而对 *R* 口袋中主要位点的研究发现, 由于 *R* 口袋比 *S* 口袋具有更大的空间柔性, 其空间位阻的改变对活性的影响并非如此明显^[10]。但这并不表示在对扁桃酸消旋酶进行活性改造时 *R* 口袋中的位点可以被忽略。相反, 本研究表明, 第 22 位氨基酸侧链极性的改变对活性有重要影响。因此, 在对酶的结合口袋区域进行理性设计时, 不仅要考虑空间位阻效应, 还需考虑疏水作用和静电作用。

3 结论

本研究应用分子动力学模拟研究了扁桃酸消旋酶第 22 位氨基酸侧链对其活性的影响。结果表明 Val22 被 Arg 替代后对 *R* 型底物疏水端产生静电排

斥作用, 导致了结合状态系统势能的上升和酶活性的下降。从而说明了该位点侧链基团与 *R* 型底物间的静电作用对酶的催化活性有重要影响, 为进一步合理地设计扁桃酸消旋酶的正向突变体提供了理论支持。

参 考 文 献

- [1] Barroso M, Arnaut LG, Formosinho SJ. The role of reaction energy and hydrogen bonding in the reaction path of enzymatic proton transfers[J]. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 2009, 22(3): 254–263.
- [2] Resch V, Fabian WMF, Kroutil W. Deracemisation of mandelic acid to optically pure non-natural L-phenylglycine via a redox-neutral biocatalytic cascade[J]. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 2010, 352(6): 993–997.
- [3] Landro JA, Gerlt JA, Kozarich JW, et al. The role of lysine 166 in the mechanism of mandelate racemase from *Pseudomonas putida*: mechanistic and crystallographic evidence for stereospecific alkylation by (R)- α -phenylglycidate[J]. *Biochemistry*, 1994, 33(3): 635–643.
- [4] Siddiqi F, Bourque JR, Jiang HY, et al. Perturbing the hydrophobic pocket of mandelate racemase to probe phenyl motion during catalysis[J]. *Biochemistry*, 2005, 44(25): 9013–9021.
- [5] Maurice MS, Bearne SL. Hydrophobic nature of the active site of mandelate racemase[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(9): 2524–2532.
- [6] Mitra B, Kallarakal AT, Kozarich JW, et al. Mechanism of the reaction catalyzed by mandelate racemase: importance of electrophilic catalysis by glutamic acid 317[J]. *Biochemistry*, 1995, 34(9): 2777–2787.
- [7] Barrett WC, Budihas SR, Gerlt JA. Mechanism of the reaction catalyzed by mandelate racemase—studies of the electrophilic catalyst and enolic intermediate[J]. *Faseb Journal*, 1995, 9(6): A1296–A1296.
- [8] Schafer SL, Barrett WC, Kallarakal AT, et al. Mechanism of the reaction catalyzed by mandelate racemase: structure and mechanistic properties of the D270N mutant[J]. *Biochemistry*, 1996, 35(18): 5662–5669.
- [9] Kallarakal AT, Mitra B, Kozarich JW, et al. Mechanism of the reaction catalyzed by mandelate racemase: structure and mechanistic properties of the K166R mutant[J]. *Biochemistry*, 1995, 34(9): 2788–2797.
- [10] Bourque JR, Bearne SL. Mutational analysis of the active site flap (20s loop) of mandelate racemase[J]. *Biochemistry*, 2008, 47(2): 566–578.
- [11] 王宏梅, 赵心清. 一步 PCR 法对拟南芥 ATPK64 基因的快速定点突变[J]. *华中农业大学学报*, 2008, 27(1): 19–21.
- [12] Bordoli L, Kiefer F, Arnold K, et al. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace[J]. *Nature Protocols*, 2009, 4(1): 1–13.
- [13] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2004, 25(13): 1605–1612.
- [14] van der Spoel D, Lindahl E, Hess B, et al. GROMACS: fast, flexible, and free[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2005, 26(16): 1701–1718.
- [15] Oostenbrink C, Villa A, Mark AE, et al. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53a5 and 53a6[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2004, 25(13): 1656–1676.