

研究报告



共价交联捕获聚酮合成中的酮基还原酶和酰基载体蛋白结构域的瞬时复合物

徐徐 郑舰艇*

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:【背景】在模块化聚酮合成酶(polyketide synthase, PKS)的催化过程中,催化结构域与同源酰基载体蛋白(acyl-carrier protein, ACP)之间的蛋白质-蛋白质相互作用起重要作用,但这种瞬时可逆的相互作用难以捕捉分析。【目的】获得 ACP 和酮基还原酶(ketoreductase, KR)相互作用的蛋白复合物。【方法】在 KR 和 ACP 之间的 Linker 上插入烟草蚀纹病毒(tobacco etch virus, TEV)蛋白酶切位点,通过双功能马来酰亚胺试剂 BMH 将 KR 和 ACP 共价交联,随后 TEV 酶切检测交联结果。调整反应条件,使交联效率最大化。根据 KR-ACP 交联复合物与体系内其他蛋白标签和分子量的差异,通过亲和层析和凝胶过滤等纯化手段,获得纯度较高的 KR-ACP 稳定交联复合物。【结果】单独表达的 KR 和 ACP 结构域交联不成功,融合表达的 KR+ACP 双结构域可以有效交联,结合使用亲和层析和凝胶过滤等纯化手段成功获得纯度较高的复合物。该策略可运用于多个 KR 和 ACP 的共价交联。【结论】建立了捕获并纯化 KR 和 ACP 瞬时相互作用复合物的有效方法,为后期晶体结构的解析、KR 与 ACP 相互作用机理的揭示及参与相互作用关键氨基酸的鉴定提供了实验基础。

关键词: 酰基载体蛋白, 酮基还原酶, 化学交联, 蛋白相互作用, 聚酮合酶

Trapping transient complex of ketoreductase and acyl carrier protein domains of modular polyketide synthases by covalently cross-linking

XU Xu ZHENG Jian-Ting*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Background] The protein-protein interaction between catalytic domains and the cognate acyl carrier protein (ACP) of modular polyketide synthases (PKSs) are essential for PKSs to function normally, but difficult to trapping due to the transient nature. [Objective] In this research, we tried to obtain stable protein complex of ketoreductase and ACP domains of modular PKSs. [Methods] Bifunctional maleimide agents, BMH, were used to cross-link KR and ACP domains while a tobacco etch virus (TEV) protease

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31770068); National Key Research and Development Program of China (2019YFA0905400)

*Corresponding author: Tel: 86-21-34205106; E-mail: jtzheng@sjtu.edu.cn

Received: 07-04-2020; Accepted: 27-05-2020; Published online: 12-06-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31770068); 国家重点研发计划(2019YFA0905400)

*通信作者: Tel: 021-34205106; E-mail: jtzheng@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2020-04-07; 接受日期: 2020-05-27; 网络首发日期: 2020-06-12

was inserted into the linker between KR and ACP to help the confirmation of the cross-linked complex. Reaction conditions were optimized to increase the cross-linker efficiency. Stable pure KR-ACP complex was obtained by affinity and size exclusion chromatography according to the tags of proteins and their molecular weight. **[Results]** The cross-linking of isolated KR and ACP was unsuccessful. However, the fused di-domain of KR and ACP could be cross-linked efficiently and generated stable pure complex following affinity and size exclusion chromatography. This strategy is useful for KR and ACP domains from different modular PKSs. **[Conclusion]** A method for capturing and purifying stable KR and ACP complexes was established.

Keywords: Acyl carrier protein, Ketoreductase, Chemical cross-linking, Protein-Protein interaction, Polyketide synthase

聚酮是一类典型的微生物天然产物, 具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤和免疫抑制等药理活性, 是小分子药物的重要来源。尽管聚酮化合物种类繁多、结构多样, 负责催化其合成的聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)却有着相似的合成机制。根据组织方式的不同, PKS 划分为 I、II 和 III 型。其中, 对 I 型模块 PKS 的研究最为透彻, 其由多个催化模块组成, 每个模块含有一套线性排列、非重复使用的功能域。在 I 型模块化 PKS 装配线中, 酰基载体蛋白(acyl-carrier protein, ACP)负责运输聚酮中间体到酮基合成酶(ketosynthase, KS)、酰基转移酶(acyltransferase, AT)、酮基还原酶(ketoreductase, KR)、脱水酶(dehydratase, DH)、烯酰还原酶(enoyl reductase, ER)和硫酯酶(thioesterase, TE)等催化结构域附近, 参与聚酮合成的每一个步骤^[1]。因此, ACP 与催化结构域间的蛋白相互作用对 PKS 的功能有重大影响, 明确该蛋白相互作用, 可为 PKS 定向改造以及获得新的酮衍生物奠定基础。

KR 以 NADPH 为辅因子, 立体特异性地还原中间体的 β -酮基为 β -羟基, 同时控制相邻 α -取代基的立体结构; 根据产物中 α -甲基和 β -羟基的构型, KR 可被划分为 A1、A2、B1 和 B2 四种类型^[2-3]。Moretto 等研究表明, KR-辅因子复合物具有与 ACP 相互作用的界面区, 而 ACP 所携带的磷酸泛酰巯基乙胺臂可将酰基底物传递到 KR 活性中心^[4]。尽管人们利用 KR 立体特异性的体外研究, 对其催化机理有了一定的了解, 但对 KR 结构域进行体内工

程改造的结果却无法与理论结果完全符合^[5]。因此, 揭示 KR 与 ACP 相互作用机理、鉴定参与相互作用的关键氨基酸, 可有助于 KR 立体特异性的理性设计。由于 ACP 与 KR 相互作用过程存在可逆性, 捕获 KR 和 ACP 间微弱作用的瞬间, 实现蛋白复合物的结构可视化和分析工作依旧面临困难。

在 PKS 的蛋白相互作用研究中, 基于催化机制的共价交联是一种有效手段, 其原理是根据催化机制设计特定的交联剂, 通过共价交联获得稳定复合物用于晶体结构分析。为了捕获 KS 结构域与其同源 ACP 之间的瞬时相互作用状态, Kapur 等合成了一系列通过磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(PTase)连接到 ACP 活性位点丝氨酸的 CoA 类似物^[6]。当相互作用发生时, 这些类似物的另一端便可进入 KS 的活性口袋, 与活性位点半胱氨酸结合。类似地, Miyanaga 等采用了一种双功能马来酰亚胺试剂 BMOE 作为交联剂来捕获处于功能状态的 AT-ACP 瞬时相互作用复合物^[7]。AT 活性口袋中催化氨基酸经突变为半胱氨酸, 当 AT 和 ACP 发生相互作用时, 其所携带的巯基(-SH)和 holo-ACP 所携带的巯基(-SH)可分别与 BMOE 两头的马来酰亚胺基团发生化学交联, 形成硫醚键, 这一化学键在正常生理缓冲条件和还原环境下都能保持稳定。

为了捕获 KR 和 ACP 的瞬时相互作用中间体, 本研究以两性霉素 B (amphotericin B) PKS 第 2 个模块的 AmpKR2 及其同源 AmpACP2 作为研究对象, 在 KR 和 ACP 之间的 Linker 上插入烟草蚀纹病毒(tobacco etch virus, TEV)蛋白酶切位点,

采用双功能马来酰亚胺作为交联剂, 将 AmpKR2 的活性位点与其同源 AmpACP2 共价交联, 并通过亲和层析和凝胶过滤等纯化手段获得稳定的 Amp(KR-ACP)2 复合物, 建立了一个捕获并纯化蛋白复合物的通用策略, 便于后续复合物的结构分析。

表 1 研究中用到的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primers name	序列 Sequences (5'→3')
AmpKR2-F	ATCGTAATCCATATGGACGCCCTGCGC
AmpKR2-R	TGATTTCGATGAATTC <u>ACTCGTCGCTGAGCGCCGAGACG</u>
AmpACP2-F	ATCGTAATCCATATGGACGCCCTGCGC
AmpACP2-R	TGATTTCGATGAATTC <u>AGCCGGTGTCCGCCTCATCG</u>
G-pET28a-R	CTCGAGCACCACCACCACCAC
G-pET28a-F	GGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTCTAGAG
G-AmpKR2-F	GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAACCATGGACGCCCTGCGCTACCACA
G-AmpKR2-R	GCCCTGAAAATACAGGTTTTCTCGTCGCTGAGCGCCGAGA
G-AmpACP2-F	GAAAACCTGTATTTTCAGGGCGGCCCGGCCGACGGTGG
G-AmpACP2-R	GGTGGTGGTGCTCGAGGCCGGTGTCCGCCTCATCG
G-PikKR1-F	GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAACCATGACCGCGGACGACTGGCGCTAC
G-PikKR1-R	GCCCTGAAAATACAGGTTTTCTCGTCGATGATGCGCCGCACCTC
G-PikACP1-F	GAAAACCTGTATTTTCAGGGCGGGACAGCGCCACGTCC
G-PikACP1-R	GGTGGTGGTGCTCGAGGTCGCCCGTCTCCTCGTCACC
G-AmpKR11-F	GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAACCATGTGGCGCTACCGCCCGACCTGG
G-AmpKR11-R	GCCCTGAAAATACAGGTTTTCGGCAGCGCGGTGAGCCGCTGCAC
G-AmpACP11-F	GAAAACCTGTATTTTCAGGGCGAGCAGAGCGCCGGGGAC
G-AmpACP11-R	GGTGGTGGTGCTCGAGGGCGCCCGGAGTGGACGTC
AmpKR2-S354C-F	ACGCGTTCGTGCTGTTCTCGTGCGGCGCCGCGGTCTGGGGC
AmpKR2-S354C-R	CGAGAACAGCACGAACCGTCCAGGTCGAGGTCGGCGG
AmpKR2-C121S-F	GACTCACCGCGCCCCCTGTGGAGCCTGACCCGGGGCGGTG
AmpKR2-C121S-R	CCACAGGGGCGCGGTGAGTCCCAGCTCGCCGAGGGCCT
AmpKR2-C278S-F	TCCGGGTGACCATCGCCGCCAGCGACGCCCGACCGGG
AmpKR2-C278S-R	GGCGGCGATGGTACCCGACGCCAGCTGCTCCAGTT
PikKR1-S345C-F	CCCGGGACCTCGACCTCGACGCGTTCGTGCTCTTCTCG
PikKR1-S345C-R	TGCCCAGAGTGCTCGACACGCACGAGAAGAGCACGAACGCGT
PikKR1-C270S-F	CCCGCGTCACCATCGCCGCTCCGACGTCGCCGACCCCCAC
PikKR1-C270S-R	GGCGGCGATGGTACGCGGGCGCCGATGCGGTGAGTT
AmpKR11-S351C-F	CGACTTCGTCTGTACTCTGACCCGCCGATGTGGGGC
AmpKR11-S351C-R	GGAGTACAGGACGAAGTCGTCCAGCTCCTCGTCGTCGA
AmpKR11-C55S-F	GGCTCGTCTGGACGAGACTCCACCGACCGCCGTGCT
AmpKR11-C55S-R	GCTCTCGTCCAGGACGAGCCGGCGCACCTCGGCGCCGC
AmpKR11-C150S-F	GCTGGACCGCCGCGCTGGAGTCCCCGGGACGCTGGGGCGG
AmpKR11-C150S-R	CTCCAGCGCGCGGTCCAGCCGATGCCGGTGACCTGGG
AmpKR11-C275S-F	CCGAGACGACCCTCGCCGCTCCGACATCACCGACCGTGAC
AmpKR11-C275S-R	GGCGGCGAGGGTCGTCTCGGTGCCGCTCCGCCAGCT

注: *Nde* I 和 *Eco* R I 酶切位点用斜体表示, 终止密码子用下划线表示。

Note: The *Nde* I and *Eco* R I sites are italicized and the termination codon is underlined.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及引物

Escherichia coli BL21、*E. coli* BAP1、*E. coli* DH10B 及质粒 pET-28a(+)均为本实验室保藏。引物如表 1 所示, 由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶和交联剂 BMOE、BMB、BMH, Thermo Fisher Scientific 公司; 真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒和胶回收试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; Gibson 组装试剂盒, 上海翊圣生物科技有限公司。

超微量核酸蛋白分析仪, Thermo Fisher Scientific 公司; 快速蛋白液相色谱仪(Fast protein liquid chromatography, FPLC)、聚合链式核酸扩增仪和脱盐预装重力流柱, Bio-Rad 公司; 预装柱 HisTrap HP、Superdex 75 Increase 10/300 GL 和 Superdex 200 Increase 10/300 GL, General Electric 公司; 生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 方法

使用真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取 *Streptomyces nodosus* 基因组。

以 *Sreptomycetes nodosus* 基因组为模板, 根据已报道的 AmpKR2 晶体结构^[8]设计引物, 进行基因片段扩增, PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times Phanta Max Master Mix 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, DNA 模板(100 ng/ μ L) 1 μ L, DMSO 2.5 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 1 μ L, Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase (1 U/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 15.5 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 扩增产物回收并利用 *Nde* I 和 *Eco*R I 进行酶切, 连接至酶切好的 pET-28a(+)质粒中, 构建 pET-28a-AmpKR2 表达载体。

从 AmpKR2/NADPH/底物类似物的三元晶体结构中, 可以观察到位于催化通道中的 Ser-354 通过一个水分子与底物类似物形成氢键, 所以首先考虑将这一活性位点突变为携带巯基(-SH)的半胱氨酸。以 pET-28a-AmpKR2 质粒为模板, 以表 1 中 AmpKR2-S354C-F 和 AmpKR2-S354C-R 为引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系和条件同上。PCR 产物经 *Dpn* I 内切酶 37 $^{\circ}$ C 消化处理 1.5 h 后, 转化进

E. coli DH10B 感受态细胞, 测序正确后得到突变质粒 pET-28a-AmpKR2 S354C。

从聚酮合酶数据库 (Dobiscuit) 中找到 AmpACP2 的大致序列, 并从 NCBI 网站中找到已解析结构且与 AmpACP2 序列一致性最高的蛋白, 即 EryACP2 (41%)^[9]。通过 ClustalX 对二者序列进行比对, 从而确定 AmpACP2 的蛋白边界, 设计引物并构建表达质粒 pET-28a-AmpACP2。构建方法同 pET-28a-AmpKR2。

将构建好的表达质粒 pET-28a-AmpKR2 S354C 转化进 *E. coli* BL21 感受态细胞, pET-28a-AmpACP2 转化进 *E. coli* BAP1 感受态细胞, 依次经 *E. coli* 16 $^{\circ}$ C 低温诱导、镍柱亲和层析和蛋白快速液相色谱层析, 得到纯度较高的 AmpKR2 S354C 蛋白和成功携带泛酰巯基乙胺臂的 holo-AmpACP2 蛋白。

1.2.1 AmpKR2 与同源 ACP 单结构域交联

单结构域交联反应体系: 50 μ mol/L AmpKR2 S354C, 150 μ mol/L holo-AmpACP2, 500 μ mol/L NADP⁺ 和 1 mmol/L BMOE/BMB/BMH。分别在 20 $^{\circ}$ C 孵育 6 h 后, 反应结果经 SDS-PAGE 进行检测。若交联发生, 便可观察到交联复合物(64 kD)的条带, 与反应底物 AmpKR2 S354C (50 kD)和 holo-AmpACP2 (14 kD)的蛋白条带位置有所区别。

1.2.2 双结构域交联

ACP 与 KR 之间的亲和力仅能达到微摩尔级别^[4], 在自由环境下 ACP 的磷酸泛酰巯基乙胺臂很难自主进入 KR 的活性中心, 二者发生结合的概率也较低。如果能够提高 KR 和 ACP 的相对浓度, 二者发生结合并交联的概率便可增加^[10]。在 KR 和 ACP 之间的连接多肽插入一个 TEV 限制酶切位点, 表达 KR+ACP 的融合蛋白, 提高二者相对浓度的同时也方便交联结果的判断。

将 AmpKR2 S354C 与 AmpACP2 通过 TEV 酶切位点共价相连后, 为避免 AmpKR2 自身存在的半胱氨酸引起非特异性交联现象, 将 KR 的其他所有半胱氨酸(第 121 位和 278 位)全部突变为丝氨酸, 依次以表 1 中 AmpKR2-C121S-F/AmpKR2-C121S-R

和 AmpKR2-C278S-F/AmpKR2-C278S-R 为引物进行 PCR 扩增, PCR 反应体系和条件同上。PCR 产物经 *Dpn* I 内切酶 37 °C 消化处理 1.5 h 后, 转化进 *E. coli* DH10B 感受态细胞, 测序正确后得到突变质粒 pET-28a-Amp(KR+ACP)2 S354C/C121S/C278S。将这一突变质粒转入 *E. coli* BAP1 感受态细胞, 依次经 *E. coli* 16 °C 低温诱导、镍柱亲和层析和蛋白快速液相色谱层析, 得到纯度较高且成功携带泛酰巯基乙胺臂的 holo-Amp(KR+ACP)2 S354C/C121S/C278S 蛋白。

Amp(KR+ACP)2 S354C/C121S/C278S 双结构域交联反应体系: 150 μmol/L holo-Amp(KR+ACP)2 S354C/C121S/C278S, 1.5 mmol/L NADP⁺, 1 mmol/L BMOE/BMB/BMH。分别在 20 °C 孵育 6 h 后, 添加 5 mmol/L β-巯基乙醇终止交联反应。随后, 按照融合蛋白与 TEV 酶(5:1, 摩尔比)的比例, 即加入工作浓度为 30 μmol/L 的 TEV 酶(携带 His-tag, 分子量约为 28 kD), 在 4 °C 下酶切过夜。反应结果用 SDS-PAGE 进行检测。

为了提高交联效率, 按照表 2、3 和 4 的反应条件分别对孵育温度、孵育时间和蛋白质与交联剂的浓度进行调整。

表 2 不同孵育时间的交联反应

Table 2 Cross-linking reaction taken under different incubation times

Group	1	2	3	4	5	6
Amp(KR+ACP)2 (μmol/L)	150	150	150	150	150	150
BMH (mmol/L)	1	1	1	1	1	1
Temperature (°C)	20	20	20	20	20	20
Time (h)	0.25	0.5	1	2	4	6

表 3 不同孵育温度的交联反应

Table 3 Cross-linking reaction taken under different incubation temperatures

Group	1	2	3
Amp(KR+ACP)2 (μmol/L)	150	150	150
BMH (mmol/L)	1	1	1
Temperature (°C)	4	20	30
Time (h)	6	6	6

表 4 蛋白和 BMH 不同浓度的交联反应

Table 4 Cross-linking reaction taken under different concentrations of protein and BMH

Group	1	2	3	4	5
Amp(KR+ACP)2 (μmol/L)	150	150	150	200	200
BMH (mmol/L)	1	1.5	2	1	1.5
Temperature (°C)	20	20	20	20	20
Time (h)	6	6	6	6	6

为了证实该交联策略的通用性, 另构建了两个 KR+ACP 质粒, Pik(KR+ACP)1 (来自苦霉素 pikromycin 合成途径, 其所含 KR 为 B2 型)和 Amp(KR+ACP)11 (其所含 KR 为 A2 型)。采用与 pET-28a-Amp(KR+ACP)2 相同的构建策略, 即将 TEV 限制性位点插入 KR 和 ACP 的柔性多肽之间, 对 KR 域和 ACP 域进行共价束缚。在 Pik(KR+ACP)1 的第 345 位丝氨酸和 Amp(KR+ACP)11 第 351 位丝氨酸处引入半胱氨酸的突变, 这 2 个丝氨酸分别是其 KR 域活性口袋中的催化残基, 并将 KR 中其余无关的半胱氨酸突变为丝氨酸。蛋白表达纯化和后续交联反应操作与 Amp(KR+ACP)2 相似。

1.2.3 Amp KR-ACP2 交联复合物纯化

为了方便 KR-ACP 复合物的纯化, 参与交联反应的 holo-Amp(KR+ACP)2 S354C/C121S/C278S 蛋白的组氨酸标签置于蛋白的 C 端, 即连接在 ACP 结构域的末端。因此, 经 TEV 酶切消化后的未交联 KR 结构域不携带任何蛋白标签, 有利于在随后的纯化步骤中将其去除。根据目标 KR-ACP 交联复合物与其他杂质蛋白的附着标签和分子量差异, 结合使用亲和层析和凝胶过滤色谱等方法获得纯度较高的交联复合物。

在最佳反应条件 150 μmol/L holo-Amp (KR+ACP)2 S354C/C121S/C278S、1.5 mmol/L NADP⁺和 1 mmol/L BMH 条件下, 进行大规模交联反应。交联反应结束后, 需要先去除反应中残留的 BMH, 因其可能会与后续加入的 TEV 酶的催化半胱氨酸残基发生反应, 降低 TEV 酶的活性。因此, 在 20 °C 下交联孵育 6 h 后, 将交联反应混合物经脱盐柱去除混合物中多余的 BMH。在脱盐柱中,

蛋白多肽会被排除在色谱柱的孔之外, 保留在流动相中, 并在样品流出后被立即洗脱下来。然而小分子 BMH 由于进入脱盐柱后会被阻滞, 后于多肽被洗脱, 从而与目标肽分离。在收集的蛋白多肽中按照融合蛋白与 TEV 酶(5:1, 摩尔比)的比例加入谷胱甘肽标记的 TEV 酶(GST-TEV), 即保证 TEV 酶的工作浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下酶切过夜。因此, 经 GST-TEV 酶消化后的反应体系中就包含了带有组氨酸标签的 KR-ACP 交联复合物和未交联的 ACP、带有谷胱甘肽标签的 TEV 酶和未交联且无任何标签标记的 KR。将消化后混合物样品上样到 HisTrap 的预装柱中, 根据不同蛋白质与亲和色谱介质不同的结合能力, 去除 GST-TEV 酶和无任何标签的 KR。利用咪唑浓度为 0–200 mmol/L 的洗脱液进行线性梯度洗脱, 通过 SDS-PAGE 对不同浓度梯度洗脱成分进行分析, 收集纯度较高的组氨酸标记的交联复合物和未交联的 ACP。随后, 将所得 KR-ACP 交联复合物和未交联的 ACP 混合物(其理论分子量分别为 64 kD 和 14 kD)上样到 Superdex 75 凝胶过滤柱中。由于空间位阻, 不同大小的蛋白分子与色谱柱多孔基质具有不同程度的接触, 且较小的分子具有较大的接触, 因此蛋白分子会按照大小递减的顺序依次被洗脱下来。在这种情况下, 较大分子量的 KR-ACP 复合物将先于 ACP 被洗脱下来, 在出峰时间内将其进行收集。使用 Image J (基于 Java 的图像分析软件)对最终交联复合物的 SDS-PAGE 条带进行灰度值量化分析。

2 结果与分析

2.1 AmpKR2 与同源 ACP 单结构域交联结果

三种交联剂 BMOE、BMB 和 BMH 具有相同的反应活性, 但间隔臂长度不同, 其中 BMH 的间隔臂最长, 而 BMOE 最短。对这 3 种交联剂参与的单结构域交联反应进行 SDS-PAGE 检测, 结果如图 1 所示。除单独的 KR 域(50 kD)和 ACP 域(14 kD)蛋白条带外, 在蛋白 Marker 的 25 kD 和 35 kD 条带位置中间出现一条新的蛋白条带, 根据分子量大小, 猜测这一条带为 2 个 ACP 泛酰巯基乙胺臂上的巯基经交联剂共价连接形

成 ACP 的二聚体形式。除此之外, 并没有观察到 KR 域和 ACP 域共价交联的蛋白条带。单结构域交联失败的可能原因是 ACP 与 KR 之间的亲和力太弱, 自由环境下 2 个结构域相对浓度低而不易发生结合。

2.2 双结构域交联结果

考虑到因单结构域相对浓度过低而导致的交联失败, 将 KR 和 ACP 通过一个柔性多肽进行共价连接、获得 Amp(KR+ACP)₂ 融合蛋白, 可提高 KR 和 ACP 的相对浓度, 促进二者相互结合。当这一融合蛋白参与交联反应时, 由于交联的发生并没有带来蛋白分子量的显著增加, 交联复合物与未交联融合蛋白在 SDS-PAGE 中的条带位置差异并不明显, 给交联结果的判断带来阻碍。为此, 在 AmpKR2 S354C 和 ACP 之间的连接多肽之间插入一个 TEV 限制酶切位点,

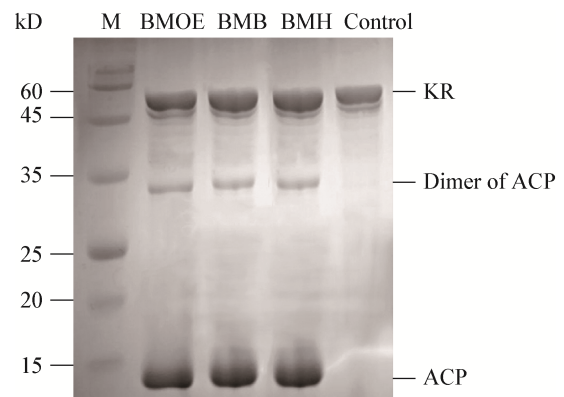


图 1 AmpKR2 与同源 ACP 单结构域交联反应混合物的 SDS-PAGE 分析

Figure 1 SDS-PAGE analysis of AmpKR2 S354C and holo-ACP2 cross-linking reaction mixtures

注: BMOE、BMB 和 BMH 泳道分别含 50 $\mu\text{mol/L}$ AmpKR2 S354C (50 kD)、150 $\mu\text{mol/L}$ holo-ACP2 (14 kD)和 1 mmol/L BMOE、BMB、BMH; Control 为对照组, 仅包含 AmpKR2 S354C 和 BMOE。与对照组相比, 实验组中仅在 25 kD 和 35 kD 之间的位置出现一条新的条带, 猜测为经交联剂共价交联形成的 ACP 二聚体, 没有出现预期的 KR-ACP 的复合物条带。

Note: A: Lane BMOE, BMB and BMH contained 50 $\mu\text{mol/L}$ AmpKR2 S354C (50 kD), 150 $\mu\text{mol/L}$ holo-ACP2 (14 kD) and 1 mmol/L BMOE, BMB and BMH; lane Control only contained AmpKR2 S354C and BMOE. Compared with the control group, there was only a new band between 25 kD and 35 kD in the experimental group, this new one was supposed to be the ACP dimer connected by the covalent cross-linker; but no expected band of KR-ACP complex was observed.

若交联未发生,融合蛋白内未交联的 KR 和 ACP 会被消化成 2 个独立的单结构域;反之,双结构域蛋白虽然被酶切,但由于交联剂的存在,其依旧可以保持一个双结构域的状态。Amp(KR+ACP)₂ 的双结构域交联反应经 TEV 酶消化后的 SDS-PAGE 分析如图 2 所示,在交联剂存在的情况下,除加入的 TEV 酶(28 kD),以及因未发生交联而被 TEV 酶消化为单独 KR 域和 ACP 域的蛋白条带外,在蛋白 Marker 的 53 kD 和 70 kD 条带位置中间出现一条新的蛋白条带,根据分子量大小,这一蛋白条带与 KR-ACP 的交联复合物的表观分子量(64 kD)相对应。然而在不含交联剂的对照组中,仅存在 TEV 酶、单独的 KR 域和 ACP 域蛋白条带,并没有这一新的条带。这一结果表明,交联剂的加入的确导致部分 KR 域和 ACP 域发生共价交联,使之在经历 TEV 酶切后依旧保持双结构域的状态。此外,这 3 种交联剂都可以通过此种策略将 KR 域和 ACP 域共价交联,得到 KR-ACP 的交联复合物。利用 Image J 对交联复合物条带和单独 KR 域条带进行灰度值量化分析,计算各个交联剂的交联效率,发现 BMH 交联效率最高(39%),而 BMB 交联效率最低(32%)。

为了获得纯度较高的 KR-ACP 交联复合物,需对交联反应条件进行优化,包括孵育温度、孵育时间和蛋白质与交联剂的浓度。不同条件下进行的交联反应经 TEV 酶切后的 SDS-PAGE 检测结果如图 3 所示,交联效率随着交联孵育时间和温度的增加而提高,但在实验过程中发现,当孵育温度达到 30 °C 或孵育时间延长到 6 h 以上时,体系中会出现少量蛋白质沉淀。在蛋白质和交联剂不同的浓度和比例下,最高交联效率出现在 holo-Amp (KR+ACP)₂ S354C/C121S/C278S 为 150 μmol/L 和 BMH 为 1 mmol/L 时。因此,最佳交联条件是在 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)中,150 μmol/L holo-Amp (KR+ACP)₂ S354C/C121S/C278S, 1.5 mmol/L NADP⁺, 1 mmol/L BMH, 20 °C 连续孵育 6 h。

为探究上述交联策略是否具备通用性,双结构域融合蛋白 holo-Pik(KR+ACP)₁ S345C/C270S 和 holo-Amp(KR+ACP)₁₁ S351C/C55S/C150S/C275S 分别与 BMH 孵育并进行酶切,结果如图 4 所示。在 BMH 存在的情况下,两个融合蛋白的实验组中均可观察到不同程度的交联现象,生成相应的共价 KR-ACP 复合物。然而在二者不含 BMH 的对照组,经 TEV 消化后的融合蛋白被酶切为单独的 ACP 域和 KR 域,证明 BMH 的加入使得部分 KR 和 ACP 发生共价交联,维持了双结构域的状态。在完全相同的反应条件下,二者的交联效率并不相同,说明不同双结构域蛋白的最佳反应条件并不相同,需要分别摸索。但二者的成功交联也表明此交联策略具有一定的通用性,可用于捕获多种不同瞬时 KR-ACP 复合物。

2.3 Amp KR-ACP₂ 交联复合物纯化

Amp KR-ACP₂ 交联复合物的纯化路线如图 2B 所示,为便于纯化,反应中利用 GST-TEV (分子量为 50 kD)进行酶切。在最佳反应条件下进行交联反应后,反应液上样脱盐柱除去多余的交联剂 BMH。收集的多肽经 GST-TEV 酶切过夜,酶切后的反应液含交联复合物、单独 KR 和 ACP 以及 GST-TEV。该样品由 HisTrap 预装柱分离纯化,利用不同浓度咪唑的洗脱液梯度洗脱。各中间步骤样品成分经 SDS-PAGE 检测结果如图 5 所示。携带组氨酸标签的交联复合物和单独 ACP 域会与柱内介质结合,而没有任何蛋白标签的 KR 域和谷胱甘肽标签标记的 TEV 酶则保留在流出液中被除去,二者的理论表观分子量均为 50 kD 左右。将咪唑浓度分别为 8-16、16-30、30-60、60-120 和 120-200 mmol/L 的洗脱成分进行检测可发现,纯度较高的交联复合物和未交联的 ACP 主要在 60-120 mmol/L 的咪唑浓度下被洗脱,而咪唑浓度较高或较低的洗脱液中都混有不同种类的杂质。将这一洗脱成分上样到 Superdex 75 凝胶过滤柱中,交联复合物与 ACP 域先后被洗脱,所得交联复合物经 SDS-PAGE 检测,大小与理论值一致且纯度较高。

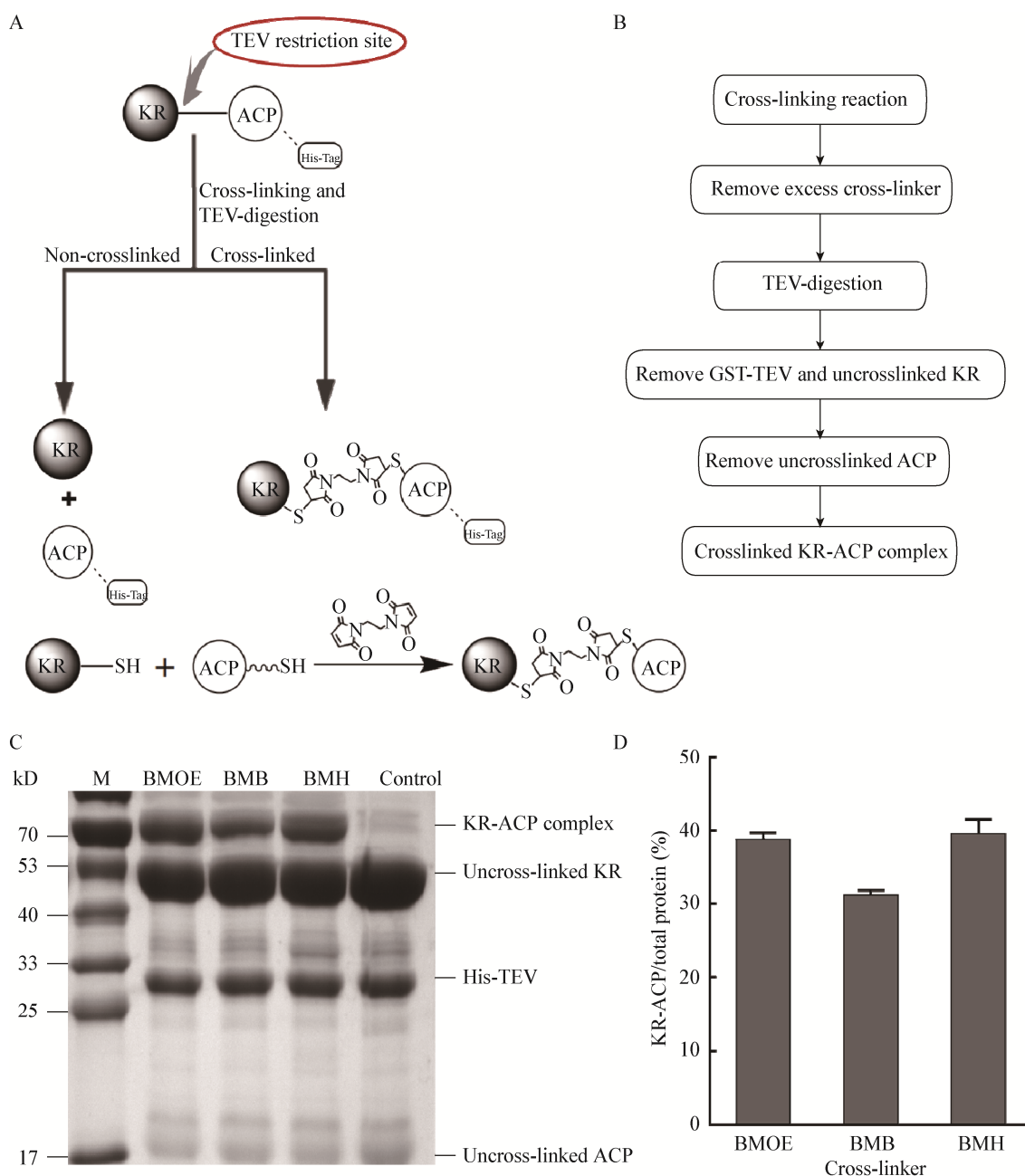


图2 双结构域交联策略与结果分析及复合物纯化路线

Figure 2 Di-domain cross-linking mechanism and results analysis and purification route of cross-linked complex

注: A: 双结构域交联策略; B: 交联复合物纯化路线; C: 双结构域交联及后续 TEV 酶切混合物 SDS-PAGE 分析: BMOE、BMB 和 BMH 分别含有 150 $\mu\text{mol/L}$ holo-Amp(KR+ACP)₂ S354C/C121/C278S (64 kD) 和 1 mmol/L BMOE、BMB 和 BMH; Control: 对照组, 不含任何交联剂, 为单独 holo-Amp(KR+ACP)₂ S354C/C121/C278S 的 TEV 酶切产物; D: 3 种不同交联剂参与下的交联效率, BMH 交联效率最高, BMB 的交联效率最低。

Note: A: Di-domain cross-linking strategy; B: Purification route of cross-linked complex; C: SDS-PAGE analysis of cross-linking and later TEV-digestion reaction mixtures containing 150 $\mu\text{mol/L}$ holo-Amp(KR+ACP)₂ S354C/C121/C278S (64 kD) and 1 mmol/L BMOE, BMB, BMH and control contained the digestion mixtures of holo-Amp(KR+ACP)₂ S354C/C121/C278S in the absence of any cross-linker; D: Cross-linking efficiencies with different types of cross-linker were calculated, BMH has the highest cross-linking efficiency and BMB has the lowest.

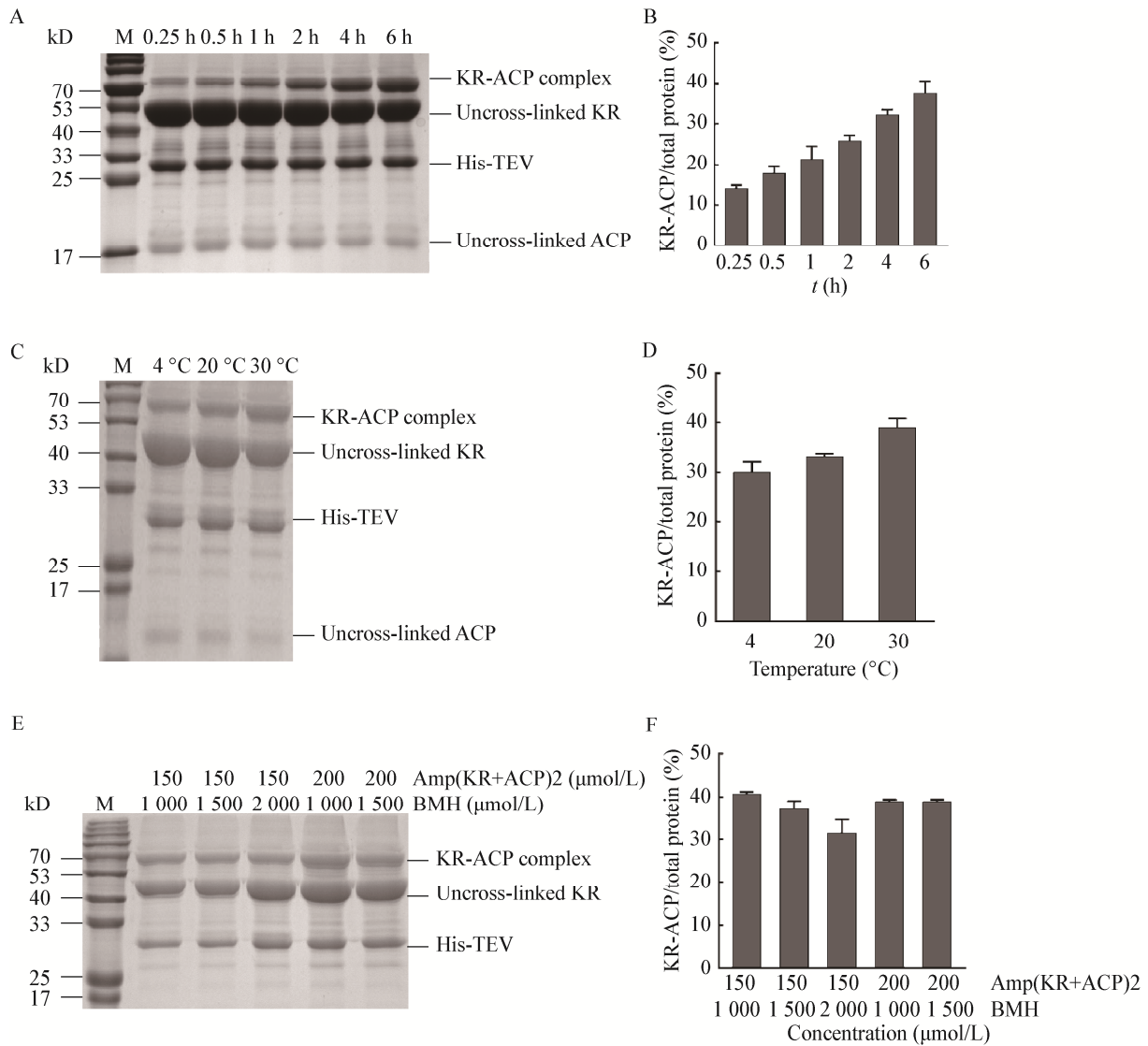


图3 交联条件优化

Figure 3 Optimization of crosslinking conditions

注: A: 150 μmol/L holo-Amp(KR+ACP)2 S354C/C121/C278S 蛋白和 1 mmol/L BMH 在 20 °C 下经历 0.25、0.5、1、2、4 和 6 h 孵育后的 SDS-PAGE 检测结果; B: 不同孵育时间下的交联效率, 交联效率随着孵育时间的延长而提高; C: 150 μmol/L holo-Amp(KR+ACP)2 S354C/C121/C278S 蛋白和 1 mmol/L BMH 分别在 4、20 和 30 °C 的不同孵育温度下交联 6 h 的 SDS-PAGE 检测结果; D: 不同孵育温度下的交联效率, 交联效率随着孵育温度的升高而提高; E: 不同浓度的 holo-Amp(KR+ACP)2 S354C/C121/C278S 蛋白和 BMH 在 20 °C 下孵育 6 h 后的 SDS-PAGE 检测结果; F: 蛋白和 BMH 不同浓度下的交联效率, 二者最优的比例为 150 μmol/L holo-Amp(KR+ACP)2 S354C/C121/C278S 和 1 mmol/L BMH。

Note: A: SDS-PAGE analysis of reaction mixtures containing 150 μmol/L holo-Amp(KR+ACP)2 S354C/C121/C278S (64 kD) and 1 mmol/L BMH, incubated at 20 °C with 0.25, 0.5, 1, 2, 4 and 6 h respectively; B: Cross-linking efficiencies with different reaction times were calculated, and the cross-linking efficiencies increased with the extension of incubation times; C: SDS-PAGE analysis of reaction mixtures containing 150 μmol/L holo-Amp(KR+ACP)2 S354C/C121/C278S (64 kD) and 1 mmol/L BMH, incubated for 6 h at 4, 20 and 30 °C respectively; D: Cross-linking efficiencies with different reaction temperatures were calculated, and the cross-linking efficiencies increased with the increase of incubation temperature; E: SDS-PAGE analysis of reaction mixtures with different concentrations of holo-Amp(KR+ACP)2 S354C/C121/C278S (64 kD) and BMH incubating at 20 °C for 6 h; F: Cross-linking efficiencies with different concentrations of protein and BMH were calculated, and the optimal concentrations were 150 μmol/L holo-Amp(KR+ACP)2 S354C/C121/C278S and 1 mmol/L BMH.

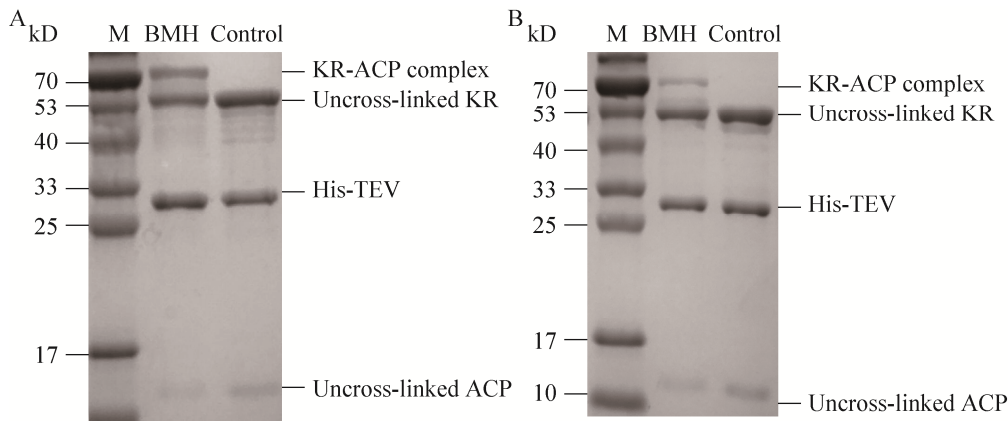


图 4 Pik(KR+ACP)1 和 Amp (KR+ACP)11 双结构域交联

Figure 4 Di-domain cross-linking of Pik(KR+ACP)1 and Amp(KR+ACP)11

注: A: 交联及后续 TEV 酶切混合物 SDS-PAGE 分析: BMH: 含 150 $\mu\text{mol/L}$ holo-Pik(KR+ACP)1 S345C/C270S (62 kD)和 1 mmol/L BMH; Control: 对照组, 不含 BMH. B: 交联及后续 TEV 酶切混合物 SDS-PAGE 分析: BMH: 含 150 $\mu\text{mol/L}$ holo-Amp (KR+ACP)11 S351C/C55S/C150S/C275S (62 kD)和 1 mmol/L BMH; Control: 对照组, 不含 BMH; 在含 BMH 的实验组中, 两组不同融合蛋白均观察到 KR-ACP 交联复合物的条带, 而在不含 BMH 的对照组中, 则没有这一分子量较大的条带出现.

Note: A: BMH: SDS-PAGE analysis of cross-linking and later TEV-digestion reaction mixtures containing 150 $\mu\text{mol/L}$ holo-Pik(KR+ACP)1 S345C/C270S and 1 mmol/L BMH; Control: Absence of any cross-linker. B: BMH: SDS-PAGE analysis of cross-linking and later TEV-digestion reaction mixtures containing 150 $\mu\text{mol/L}$ holo-Amp(KR+ACP)11 S351C/C55S/C150S/C275S and 1 mmol/L BMH; Control: Absence of any cross-linker; bands of KR-ACP cross-linked complex were observed in the BMH-containing groups, but no bands corresponding to this higher molecular weight were observed in the BMH-free groups.

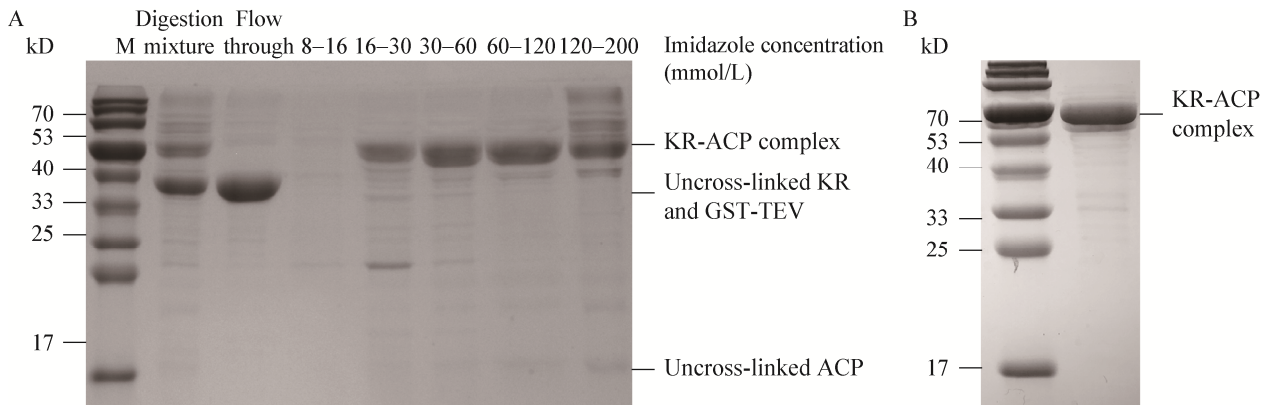


图 5 Amp KR-ACP2 交联复合物纯化

Figure 5 Purification of cross-linked Amp KR-ACP2 complex

注: A: 亲和层析中不同咪唑浓度的洗脱成分检测, 较纯的产物出现在经 60-120 mmol/L 咪唑浓度所洗脱的成分中; B: 经 FPLC 纯化所得 AmpKR-ACP2 交联复合物, 分子量大小与理论值接近(64 kD), 纯度较高.

Note: A: Elutes under different concentrations of imidazole during affinity chromatograph, the purest products appeared in the eluted components under 60-120 mmol/L imidazole concentrations; B: FPLC-purified, cross-linked AmpKR-ACP2 complex, its molecular weight was close to the theoretical value (64 kD) and the purity was high.

3 讨论与结论

自从发现 6-脱氧红霉素内酯 B 合成酶的基因序列和产物结构之间存在共线性后, 研究人员在多模块聚酮合成酶的理性设计和体外改造方面做了大量的工作^[11]。在这些大型合成酶的改造工程中, 研究人员越来越注意到蛋白质相互作用的重要性。ACP 参与合成途径中碳骨架延伸和修饰、终产物释放等步骤, 而这每一步都依赖于 ACP 和合作功能域之间特定的蛋白质相互作用。由于 ACP 与每一种合作功能域的相互作用都存在可逆性, 便于 ACP 及时向下一个合作功能域转移, 所以在研究这些蛋白-蛋白相互作用时, 遇到的一个关键挑战便是 ACP 与合作功能域之间微弱的亲和力。为了克服这一障碍, 科研人员尝试寻找或设计一些特定功能的交联剂, 捕捉两个功能域发生相互作用时的功能状态, 获得稳定的蛋白复合物用于晶体结构解析。目前, 已经成功用这种方法解析了脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FAS)或 PKS 中 ACP 与 AT、DH 和 TE 等结构域相互作用机制^[7,12-14], 但目前尚无 ACP 与 KR 相互作用复合物的结构被解析。

本研究以两性霉素 B PKS 第 2 个模块的 AmpKR2 及其同源 AmpACP2 作为研究对象, 将 AmpKR2 活性氨基酸 Ser-354 突变为携带巯基(-SH)的半胱氨酸, 并在 *E. coli* BAP1 感受态细胞中表达 AmpACP2, 使其在体内成功携带泛酰巯基乙胺臂, 以 BMH 作为交联剂, 其两端的马来酰亚胺基团会分别与 AmpKR2 第 354 位半胱氨酸所携带巯基(-SH)和 ACP 泛酰巯基乙胺臂末端巯基发生化学交联, 形成硫醚键。由于硫醚键在正常生理缓冲条件和还原环境下都能保持稳定, 可以通过 SDS-PAGE 来判断是否有蛋白复合物生成。首先单独表达了 AmpKR2 S354C 和 holo-AmpACP2 蛋白, 加入交联剂进行孵育后, 并没有发现蛋白复合物的生成。猜测交联不成功的原因是 ACP 与 KR 之间结合力弱、相对浓度低, 自由环境下二者相遇并发生结合的概

率低。为了克服这一障碍, 采用了双结构域交联的方式, 将 TEV 酶切位点插入 KR 和 ACP 的连接多肽之间, 表达双结构域的融合蛋白, 达到提高 KR 和 ACP 相对浓度的目的, 交联反应后的 TEV 酶切操作又能帮助判断交联的发生。确定此策略的确能够使得交联成功发生后, 通过亲和层析和凝胶过滤等纯化手段, 将交联体系中多余的 TEV 酶、未交联而被酶切为单独 KR 域和 ACP 域的蛋白一一去除, 成功获得了 KR-ACP 的稳定交联复合物。这一复合物纯度较高, 可用于后续复合物的晶体结构解析实验。此外, 为了验证这一策略是否具备通用性, 本研究另构建并表达了 Pik(KR+ACP)1 和 Amp(KR+ACP)11 融合蛋白, 利用相同的交联策略成功观察到不同程度的交联现象。表明这一交联策略可以成功运用到多种 KR 和 ACP 的交联反应和复合物纯化实验中, 为解析 KR 和 ACP 的复合物晶体结构奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Shen B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2003, 7(2): 285-295
- [2] Keatinge-Clay AT, Stroud RM. The structure of a ketoreductase determines the organization of the β -carbon processing enzymes of modular polyketide synthases[J]. *Structure*, 2006, 14(4): 737-748
- [3] Keatinge-Clay AT. A tylosin ketoreductase reveals how chirality is determined in polyketides[J]. *Chemistry & Biology*, 2007, 14(8): 898-908
- [4] Moretto L, Vance S, Heames B, et al. Dissecting how modular polyketide synthase ketoreductases interact with acyl carrier protein-attached substrates[J]. *Chemical Communications*, 2017, 53(83): 11457-11460
- [5] Zheng JT, Piasecki SK, Keatinge-Clay AT. Structural studies of an A2-type modular polyketide synthase ketoreductase reveal features controlling α -substituent stereochemistry[J]. *ACS Chemical Biology*, 2013, 8(9): 1964-1971
- [6] Kapur S, Worthington A, Tang YY, et al. Mechanism based protein crosslinking of domains from the 6-deoxyerythronolide B synthase[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2008, 18(10): 3034-3038
- [7] Miyanaga A, Iwasawa S, Shinohara Y, et al. Structure-based analysis of the molecular interactions between acyltransferase and acyl carrier protein in vicenistatin

- biosynthesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(7): 1802-1807
- [8] Zheng JT, Taylor CA, Piasecki SK, et al. Structural and functional analysis of A-type ketoreductases from the amphotericin modular polyketide synthase[J]. Structure, 2010, 18(8): 913-922
- [9] Alekseyev VY, Liu CW, Cane DE, et al. Solution structure and proposed domain-domain recognition interface of an acyl carrier protein domain from a modular polyketide synthase[J]. Protein Science, 2007, 16(10): 2093-2107
- [10] Kuriyan J, Eisenberg D. The origin of protein interactions and allostery in colocalization[J]. Nature, 2007, 450(7172): 983-990
- [11] Cortes J, Haydock SF, Roberts GA, et al. An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*[J]. Nature, 1990, 348(6297): 176-178
- [12] Miyanaga A, Ouchi R, Ishikawa F, et al. Structural basis of protein-protein interactions between a *trans*-acting acyltransferase and acyl carrier protein in polyketide disorazole biosynthesis[J]. Journal of the American Chemical Society, 2018, 140(25): 7970-7978
- [13] Ishikawa F, Haushalter RW, Lee DJ, et al. Sulfonyl 3-alkynyl pantetheinamides as mechanism-based cross-linkers of acyl carrier protein dehydratase[J]. Journal of the American Chemical Society, 2013, 135(24): 8846-8849
- [14] Blatti JL, Beld J, Behnke CA, et al. Manipulating fatty acid biosynthesis in microalgae for biofuel through protein-protein interactions[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e42949

编辑部公告

邀请您关注《微生物学通报》公众微信号

为了更好地与读者、作者、审稿专家和编委朋友们及时沟通、方便服务,《微生物学通报》已开通公众微信服务号。作者通过微信能及时收到稿件各流程通知,第一时间了解稿件进程并及时处理;审稿专家和编委可通过微信及时收到审稿邀请,还可通过手机审稿;读者通过微信可了解《微生物学通报》文章目录,查找阅读感兴趣的文章。

关注办法:

- 1、在微信公众号搜索“微生物学通报”或“wswxtb”;
- 2、用微信扫右边二维码:

