



研究报告

内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶关键氨基酸位点的改造提高对烷基取代 2-酮酸的催化活力

程新宽^{1,2} 陈曦² 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 天津市工业微生物重点实验室
天津 3004572 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

摘要:【背景】高效实现 D-氨基酸的生物合成一直是人们关注的热点。内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶(*meso*-diaminopimelate dehydrogenase, DAPDH)能够直接催化 2-酮酸和氨合成 D-氨基酸。【目的】提高 DAPDH 对烷基取代 2-酮酸的催化活力,并解释其催化机制。【方法】以来源于嗜热共生杆菌(*Symbiobacterium thermophilum*)的内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶(StDAPDH)为模板,在前期结构分析结合被选择位点突变结果的基础上,确定对 H227 位进行定点饱和突变,并以 D-丙氨酸、D-2-氨基丁酸、D-正缬氨酸、D-谷氨酸为底物进行筛选。【结果】获得突变体 H227Q 和 H227N。突变体 H227Q 对丙酮酸、2-氧代丁酸、2-氧代戊酸、2-酮戊二酸的比活力比野生型分别提高了 10.9、11.5、8.6 和 7.6 倍。动力学参数表明,突变体 H227Q 同时提高了酶对底物的亲和力及催化常数,使其对丙酮酸的催化效率(k_{cat}/K_m)相较于野生型提高了 9.4 倍。利用分子模拟技术分析突变体 H227Q 与产物氨基酸之间的相互作用表明,227 位的谷氨酰胺通过与氨基酸的羧酸形成氢键,使得氨基酸产物 C α 上的氢和辅酶烟酰胺环 C4 原子之间的距离缩短。【结论】利用定向进化技术提高 DAPDH 对烷基取代 2-酮酸的催化活力,有助于开发新型的高效生物催化剂,这些工作也为下一步继续进行更具挑战性的 D-氨基酸研究提供了基础。

关键词: 烷基取代 2-酮酸, 内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶, 饱和突变, 分子对接, D-氨基酸

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (21778072); Tianjin Science and Technology Commission Project (15PTCYSY00020, 15PTGCCX00060); Tianjin Education Commission Scientific Research Project (2019KJ239)

***Corresponding authors:** WU Qia-Qing: Tel: 86-22-84861963; E-mail: wu_qq@tib.cas.cn
ZHU Dun-Ming: Tel: 86-22-84861962; E-mail: zhu_dm@tib.cas.cn

Received: 14-02-2020; **Accepted:** 14-05-2020; **Published online:** 04-06-2020

基金项目: 国家自然科学基金(21778072); 天津市科学技术委员会项目(15PTCYSY00020, 15PTGCCX00060); 天津市教委科研计划(2019KJ239)

***通信作者:** 吴洽庆: Tel: 022-84861963; E-mail: wu_qq@tib.cas.cn
朱敦明: Tel: 022-84861962; E-mail: zhu_dm@tib.cas.cn

收稿日期: 2020-02-14; **接受日期:** 2020-05-14; **网络首发日期:** 2020-06-04

Mutation of a key amino acid residue of *meso*-diaminopimelate dehydrogenase enhances the catalytic activity toward alkyl substituted 2-keto acids

CHENG Xin-Kuan^{1,2} CHEN Xi² FENG Jin-Hui² WU Qia-Qing^{*2} ZHU Dun-Ming^{*2}

1 Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education; Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology; 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: [Background] Efficient biosynthesis of D-amino acids is highly desired. *Meso*-diaminopimelate dehydrogenase (DAPDH) synthesizes D-amino acids from 2-keto acids and ammonia. [Objective] To increase the catalytic activity against the alkyl substituted 2-keto acids. [Methods] Based on structural analysis and mutation results from previously selected sites, the saturation mutagenesis was carried out at the amino acid residue H227 of DAPDH from *Symbiobacterium thermophilum* (StDAPDH). The resulting mutant library was subjected to screening using D-alanine, D-2-aminobutyric acid, D-norvaline, and D-glutamic acid as substrates. [Results] The mutants H227Q and H227N were obtained. Mutant H227Q was found to have 10.9-, 11.5-, 8.6- and 7.6-folds improved enzyme activity toward pyruvic acid, 2-oxobutyric acid, 2-oxovaleric acid and 2-ketoglutaric acid, respectively, compared to that of wild-type enzyme. The kinetic parameters indicated that mutant H227Q increased the turnover number of the enzyme and the affinity of the enzyme for the substrate simultaneously, so that the catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of pyruvic acid was 9.4 folds higher than that of wild-type enzyme. Molecular modeling analysis of interaction between mutant H227Q and product amino acid, indicating that glutamine at position H227 forms a hydrogen bond with the carboxylic acid of the amino acid, so that the distance between the α -hydrogen atom of product amino acid and C4 of coenzyme nicotinamide ring was shortened. [Conclusion] Directed evolution technology has been successfully used to improve the catalytic activity of DADPH for alkyl-substituted 2-keto acids, which is helpful for the development of new high-efficiency biocatalysts. These efforts also provide guidance for our future engineering of this enzyme about more challenging D-amino acids.

Keywords: Alkyl substituted 2-keto acid, *Meso*-diaminopimelate dehydrogenase, Saturation mutation, Molecular docking, D-amino acids

D-氨基酸是许多药物分子^[1]和生物活性肽^[2]的重要结构单元,这些物质广泛用于治疗微生物感染、高血压和癌症^[3-4]。D-丙氨酸可用于合成手性药物和甜味剂^[5],而且是维生素 B6 (vitamin B6)的前体物质^[6]。D-2-氨基丁酸主要用于合成各种抑制剂(血管收缩素转换酶 2 抑制剂^[7]、基质蛋白酶抑制剂^[8])和抗增殖剂^[9-10]。D-正缬氨酸被广泛用于合成大环内酯类抗生素(16元环的 pamamycin-607)^[11]以及防御性大环生物碱(r-epilachnane)^[12-13]。D-谷氨酸是尼古丁类似物等稠环化合物的关键中间体,

可用于抗镇痛药物^[14]和心脑血管多肽药物^[15],以及新型抗生素的合成^[16]。目前,D-氨基酸可通过化学合成法、发酵法以及生物催化法来合成^[17-18]。化学法往往需要贵金属以及强酸强碱等化学试剂参与,以及保护和去保护过程,难以控制选择性,并且需要剧烈的高耗能反应条件。发酵法需要调控复杂的代谢网络,宿主细胞内多种酶的存在会增加底物/产物不必要的消耗,而且干扰目的产物的催化过程,产生的代谢产物也存在对细胞形成毒害的风险。因此,无论是从绿色环保经济节能的角度,

还是从操作简便易行的角度出发,生物催化法在合成 D-氨基酸方面均具有自身独特的优势。

研究者们利用生物催化法合成 D-氨基酸进行了多种不同酶的尝试。例如, D-氨基酸氨基转移酶、D-乙内酰脲酶、丝氨酸消旋酶、N-酰基氨基酸消旋酶、L-氨基酸脱氨酶、苯丙氨酸氨裂解酶等^[19-23]。然而这些生物催化法或多或少均存在底物难以获得、底物或产物抑制、需要借助化学试剂、需要昂贵的氨基供体、理论产率低、选择性差等不足。在生物催化法中,内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶 (*meso*-diaminopimelate dehydrogenase, DAPDH)可逆催化 2-酮酸和游离氨合成 D-氨基酸(图 1)。与上述生物催化法相比, DAPDH 可以克服上述不足。DAPDH 不仅可以高度选择性地催化内消旋-二氨基庚二酸的 D-手性中心产生 L-2-氨基-6-氧代庚二酸^[24],而且与大部分以膜蛋白形式存在的 D-氨基酸脱氢酶^[25-27]相比, DAPDH 高度的可溶性更适合进行 D-氨基酸的合成。

利用 DAPDH 催化 2-酮酸合成 D-氨基酸最早是通过来源于谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)的 DAPDH (CgDAPDH)改造实现的^[28], 2012 年 Toshihisa Ohshima 团队和本实验室分别发表了来源于嗜热球形脲芽胞杆菌(*Ureibacillus thermosphaericus* strain A1)的 DAPDH (UtDAPDH)^[29]和来源于嗜热共生杆菌(*Symbiobacterium thermophilum*)的 DAPDH (StDAPDH)^[30]合成 D-氨基酸。与 CgDAPDH 和 UtDAPDH 需要对其进行改造才能合成 D-氨基酸不同的是,本实验室报道的 StDAPDH 不仅具有极好的热稳定性,并且无需任何改造就可以高立体选择性地还原胺化短链 2-酮

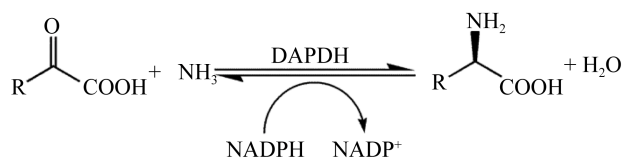


图 1 DAPDH 还原胺化 2-酮酸合成 D-氨基酸
Figure 1 2-keto acid was reductively aminated to produce D-amino acid by DAPDH

酸合成对应的 D-氨基酸^[30]。通过对 StDAPDH 进行三位点突变,其辅酶偏好性由 Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)转变为 Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)^[31]。在已经报道的 DAPDH 家族中, StDAPDH 可以催化烷基取代 2-酮酸,尤其是丙酮酸(2.87 U/mg)^[30],不过其较低的酶活限制了 DAPDH 的进一步应用。此外, DAPDH 家族结构与功能之间的关系,尤其是关键氨基酸残基对不同底物的催化机制缺乏深入研究。DAPDH 对烷基取代 2-酮酸的低活性也是助推本研究的另一大瓶颈。StDAPDH 的晶体结构已经被解析^[32],通过改造可以提高其对大位阻芳香族取代 2-酮酸的活力^[33-34]。本研究将通过分子改造提高 StDAPDH 对烷基取代 2-酮酸底物的催化活力,并进一步解析酶活力提高的催化机制,以期为以后的改造工作提供可靠的依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

感受态细胞 *Escherichia coli* BL21(DE3)和表达载体 pET-32a(+)及质粒 pET-32a-stdapdh 均由本实验室保存。

1.1.2 培养基

建立突变体库的培养基为 Terrific-Broth (TB)培养基:胰蛋白胨 12.00 g,酵母提取物 24.00 g,甘油 4.00 mL,去离子水定容至 900 mL, 1×10^5 Pa 高压灭菌 30 min,冷却至 60 °C 以下时,添加 100 mL 无菌的磷酸盐溶液(2.31 g KH_2PO_4 和 12.54 g K_2HPO_4)。表达纯化的培养基为 LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10.00,酵母提取物 5.00, NaCl 10.00, 1×10^5 Pa 高压灭菌 30 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

DNA 聚合酶 KOD Plus, TOYOBO 公司;限制性内切酶 *Dpn* I, New England Biolabs 公司;烟酰胺辅酶 NADP^+ 和 NADPH , 罗氏公司;GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo 公司;质粒提取试剂盒

和核酸纯化试剂盒, Omega 公司; 氨苄青霉素 (AMP) 和异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 生工生物工程(上海)股份有限公司; 2-酮酸底物以及其他分析纯试剂, Sigma 公司; 引物由华大基因公司合成。高压匀浆机, 北京天恩瀚拓科技有限公司; 蛋白纯化仪, 通用电气公司; 电泳仪、凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; 酶标仪, 美谷分子仪器(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 构建突变体库

将来源于 *Symbiobacterium thermophilum* IAM14863 的 DAPDH 编码基因作为目的基因, 以实验室之前构建的 pET32a-stdapdh 质粒作为模板, 以 NNK 作为简并密码子, 设计引物(表 1)对 H227 位进行定点饱和突变, 借助 QuickChange Mutagenesis 协议, 利用简并密码子 NNK 可以编码 20 种氨基酸的特性, 让 227 位除本身的组氨酸外, 可以突变为其他 19 种氨基酸中的任何一种。PCR 反应体系(50 μ L): dNTPs (2 mmol/L) 5 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 5 μ L, MgSO₄ (25 mmol/L) 3 μ L, 模板 DNA (50–100 ng) 1 μ L, 上、下游引物(100 μ mol/L)各 1 μ L, KOD PLUS DNA 聚合酶(1 U/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 33 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 63 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 7 min, 20 个循环; 68 $^{\circ}$ C 20 min。得到的 PCR 产物使用限制性内切酶 *Dpn* I 于 37 $^{\circ}$ C 消化 3 h。将消化后的 PCR 产物纯化后转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态中, 涂布在含有 100 μ g/mL AMP 的 LB 平板上, 倒置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养过夜。

表 1 建立突变体库所用引物

Table 1 Primers for mutant libraries

引物名称	引物序列	大小
Primers name	Primers sequence (5'→3')	Size (bp)
227F	GCTGATGGACGTTGGTNNKGGT GTTGTTATG	31
227R	GTTCCATAACAACACCMNNACC AACGTCCATC	32

Note: Bold letters represent degenerate bases; N: A/G/C/T; K: G/T; M: A/C.

1.2.2 突变体库的筛选

从 LB 的 AMP 抗性平板上挑选单菌落, 并将 96 个单菌落接种到含有 400 μ L TB 培养基(AMP, 100 μ g/mL)的 96 孔无菌深孔板中, 随后将 96 孔板在 37 $^{\circ}$ C、800 r/min 孵育培养 12–16 h 作为种子液。将种子液以 2% 的接种量接种到含有相同抗性的 800 μ L TB 培养基中, 相同的条件下培养至 OD₆₀₀ 约为 0.4–0.6, 冷却至 25 $^{\circ}$ C 后, 添加终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 进行诱导, 25 $^{\circ}$ C、800 r/min 培养 12 h 表达蛋白。诱导表达后的 96 孔板在 4 500 r/min 条件下离心 20 min 收集菌体, 收集后的菌体加入到每个孔添加 200 μ L 含有 2 mg/mL 溶菌酶的 Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液(200 mmol/L, pH 9.5)。并置于 37 $^{\circ}$ C、800 r/min 孵育 2 h 以破碎细胞, 破胞后在 4 $^{\circ}$ C、4 500 r/min 条件下离心 20 min, 得到的上清酶液通过显色法进行突变体库的酶活筛选。

1.2.3 筛选方法

因为 StDAPDH 可催化 D-氨基酸氧化脱氢生成对应 2-酮酸, 同时将辅酶 NADP⁺ 还原为 NADPH^[24]。在吩嗪硫酸甲酯(phenazine methosulfate, PMS, 0.01 mg/mL)存在的条件下, 辅酶 NADPH 会与氯化硝基蓝四唑(tetranitroblue tetrazolium chloride, NBT, 0.15 mg/mL)产生紫色的甲臌^[28,35], 利用显色进行筛选。利用 DAPDH 催化双向反应趋势相同的原则, 筛选获得的 D-氨基酸脱氢酶突变体具有高效催化 2-酮酸合成对应 D-氨基酸的潜力。阳性突变体测序工作委托由华大基因有限公司进行。

1.2.4 野生型和有益突变体酶的表达及纯化

将野生型和活力提高突变体的单菌落接种至含有 100 μ g/mL AMP 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下培养 12–16 h。随后以 2% 的接种量接种至 800 mL 含有相同抗性的 LB 培养基中, 同样条件下培养至 OD₆₀₀ 约 0.4–0.6 时添加终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 并于 25 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下诱导表达 20 h 后, 5 000 r/min 离心 20 min 收集菌体。

收集后的菌体采用含 10 mmol/L 咪唑的 Tris-HCl (20 mmol/L, pH 8.0) 缓冲液重悬菌体细胞, 之后利用高压匀浆机进行破胞。获得的破胞液于 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min 收集上清液, 收集的上清液经 0.45 μm 滤膜过滤后利用蛋白纯化仪进行镍柱纯化。

将纯化后的蛋白经 SDS-PAGE 检测正确后利用 10 kD 的超滤管置换成 Na₂CO₃-NaHCO₃ (pH 9.0, 100 mmol/L) 缓冲液溶解的目的蛋白, 并利用 BCA 法测定纯化后目的蛋白的浓度。

1.2.5 酶活力的测定

以 30 °C 条件下每分钟消耗 1 μmol NADPH 所需的酶量定义为 1 个酶活单位(U)。还原胺化方向活力测定^[30]: 20 mmol/L 2-酮酸, 0.5 mmol/L NADPH, 200 mmol/L NH₄Cl, 1–2 μL (10–30 μg/μL) 的纯酶, 100 mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ (pH 9.0) 缓冲液, 反应体积 0.2 mL。通过检测 340 nm 处的 NADPH 吸光值变化来表征酶活。摩尔吸光系数为 6.22 L/(mmol·cm)。每组实验重复 3 次。

动力学参数的测定与酶活测定条件相同, 2-酮酸的底物浓度选择为 5–200 mmol/L, 每个浓度测 3 次平行。利用 ORIGIN 软件进行非线性拟合计算出野生型和有益突变体对 2-酮酸底物的 K_m 以及 V_{max} , 并通过测定的蛋白浓度计算出对应的 k_{cat} 。

1.2.6 野生型和突变体的分子模拟

Discover studio 是一款基于计算生物学、生命科学和药物化学的综合软件, 可以应用于蛋白质结构和功能研究、蛋白结构模拟以及蛋白质与小分子相互作用等领域, 是面向生命科学领域的综合分子建模和模拟平台。利用 Discover studio 4.1 软件的 Design protein 模块(模拟和设计蛋白质结构的模块, 需要已知蛋白质的晶体结构作为模板)构建野生型和 H227Q 突变体的结构。优化底物和蛋白分子后, 借助于 Flexible docking 模块, 并采用默认设置进行蛋白与底物分子 D-丙氨酸的对接, 从中选出最优构型。之后根据底物在活性中心的位置, 利用 Structure-Monitor-Distance 分析催化距离以及

Non-bond interactions 分析相互作用力。

2 结果与分析

2.1 突变位点的选择及突变体库的建立和筛选

我们早期的研究表明, H227 对底物活力具有非常重要的作用^[34], 对大位阻的 2-酮酸的改造工作验证了 H227 位是提高底物活力的关键位点^[33], 分别利用 D-丙氨酸、D-2-氨基丁酸、D-正缬氨酸、D-谷氨酸作为底物, 对 H227 位建立饱和突变体库并进行筛选(引物见表 1)。

建立的突变体库利用 96 孔板进行显色筛选, 显色越快(1 min 内, 酶标仪测定 OD_{580})预示突变体的酶活越高。4 个突变体库中得到的阳性突变体经华大基因有限公司测序后确定的突变结果见表 2。

将表 2 中所有测序验证的突变体, 经过对应 2-酮酸底物验证活性后, 最终根据比较结果确定了 H227Q 和 H227N 为两个较优的突变体, 对 4 个筛选底物的比活力均具有明显提高的作用, 不同突变体库得到的阳性突变体催化对应 2-酮酸酶活的比较结果见图 2。

2.2 StDAPDH 的纯化及酶活性研究

将从突变体库筛选获得的突变体进行表达纯化, 纯化后的蛋白经 SDS-PAGE (图 3) 检测后进行酶活性研究。

利用获得的突变体 H227Q、H227N 和实验室已有的突变体 H227I 及对大位阻底物活力明显提升的突变体 W121L/H227I 对丙酮酸、2-氧代丁酸、2-氧代戊酸、2-酮戊二酸的比活力进行测定(表 3)。

表 2 筛选得到的阳性突变体测序结果

Table 2 Sequencing results of positive mutants from mutant library

D-丙氨酸	D-2-氨基丁酸	D-正缬氨酸	D-谷氨酸
D-alanine	D-2-aminobutyric acid	D-norvaline	D-glutamic acid
H227N	H227N	H227N	H227N
H227Q	H227Q	H227Q	H227Q
H227T	H227T	H227T	H227T
H227S	H227S	H227S	
H227M	H227A	H227A	
H227I	H227V	H227I	
		H227C	

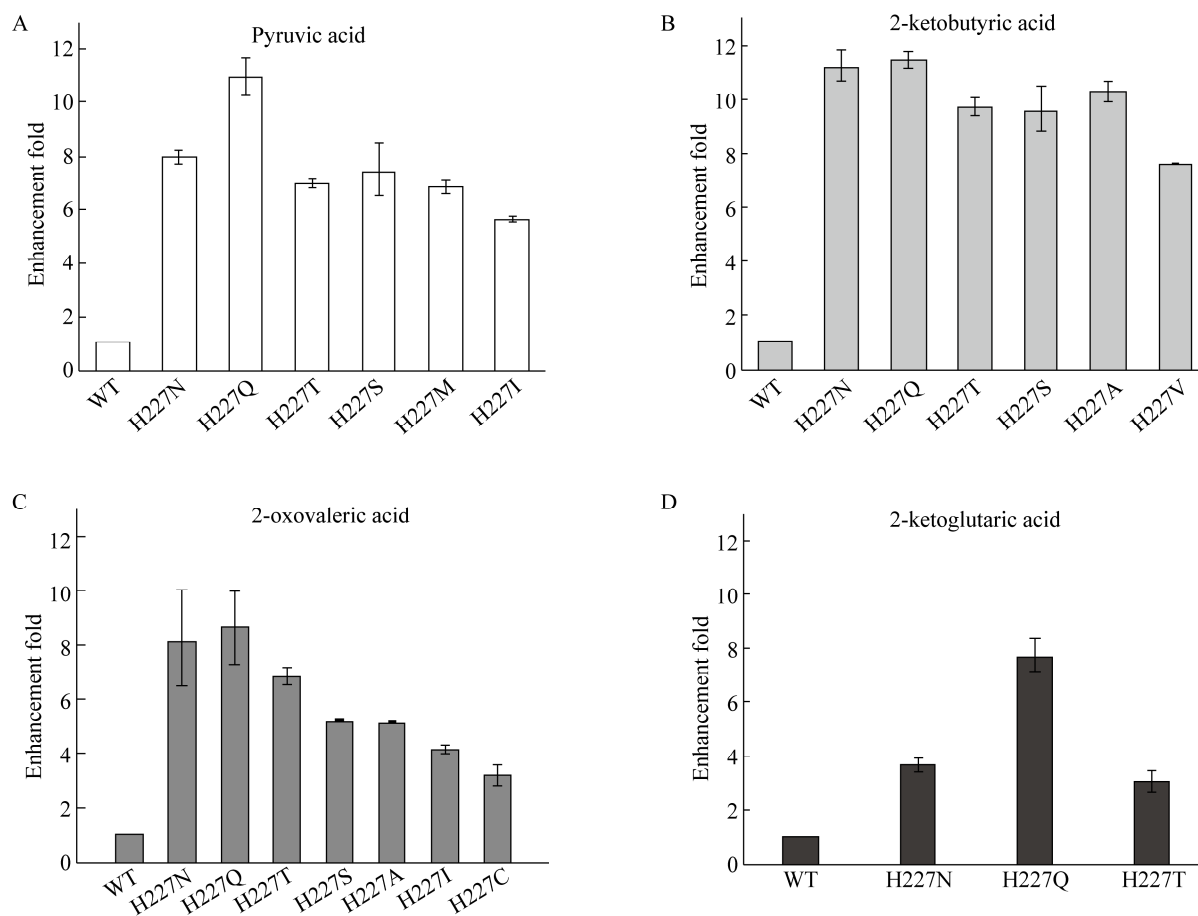


图2 突变体酶活提高倍数的比较结果

Figure 2 Comparison results of enhanced fold of activities for mutant enzyme compared to wild-type

注: A: 丙酮酸; B: 2-氧代丁酸; C: 2-氧代戊酸; D: 2-酮戊二酸.

Note: A: Pyruvic acid; B: 2-ketobutyric acid; C: 2-oxoaleric acid; D: 2-ketoglutaric acid.

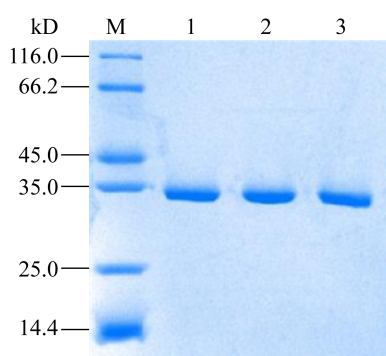


图3 SDS-PAGE 分析野生型和突变体的纯化蛋白

Figure 3 Analysis of wild-type and mutant enzymes by SDS-PAGE

注: M: 标准蛋白分子量; 1: 野生型; 2: H227Q; 3: H227N.

Note: M: Protein marker; 1: Wide-type; 2: H227Q; 3: H227N.

表3 野生型和突变体对烷基取代2-酮酸的催化活力(比活力, U/mg)

Table 3 Specific activity of wild-type and mutants on alkyl substituted 2-keto acids (specific activity, U/mg)

底物 Substrate	菌株名称 Strains			
	Wild-type	H227Q	H227N	W121L/H227I
Pyruvic acid	2.94±0.08	32.03±2.19	23.43±0.74	31.35±1.24
2-ketobutyric acid	1.62±0.09	18.57±0.50	18.18±0.99	32.16±1.84
2-oxoaleric acid	1.25±0.13	10.80±1.67	10.14±0.38	30.55±1.24
2-ketoglutaric acid	0.81±0.04	6.19±0.58	2.95±0.22	0.44±0.03

结果表明, H227Q 以及 H227N 对烷基取代 2-酮酸底物表现出比野生型更高的活力, 尤其是 H227Q, 对丙酮酸的比活力为 32.03 ± 2.19 U/mg, 对 2-酮戊二酸的比活力为 6.19 ± 0.58 U/mg, 均为已报道的最高酶活力, 并且是其他来源 DAPDH 对两个底物最高活力 (0.470 ± 0.029 U/mg^[36-37], 0.025 U/mg^[28]) 的 68 倍和 247 倍。当底物的碳原子数逐渐增加到 5 个碳时, 突变体 H227Q 和 H227N 的活力则明显下降, 突变体 H227Q 对 2-氧代戊酸的比活力仅为丙酮酸的 33%; 当 2-氧代戊酸的 5-甲基变为羧基时, 酶的比活力下降了 37%。突变体 W121L/H227I 则对丙酮酸、2-氧代丁酸和 2-氧代戊酸保持高的催化活力, 但是当底物为 2-酮戊

二酸时酶活下降了 98%。

野生型与 H227Q 突变体的动力学参数结果 (表 4) 表明, 不同于其他 2-酮酸底物, 当底物为丙酮酸时, H227Q 的 K_m 是野生型的 3.3 倍, 同时 k_{cat} 增加了 2.8 倍, 使其催化效率 (k_{cat}/K_m) 提高了 9.4 倍; 当 2-氧代丁酸、2-氧代戊酸和 2-酮戊二酸作为底物时, H227Q 相比于野生型 K_m 值出现增加, 催化活力的提高均是 k_{cat} 增加的结果, 并没有增加对底物的亲和力。

2.3 分子模拟分析酶的催化活力

将 D-丙氨酸分别与野生型和突变体 H227Q 对接后, 获得 D-丙氨酸在野生型以及 H227Q 的底物结合区域中可能的构型 (图 4)。通过对接结果可以

表 4 野生型和突变体 H227Q 对烷基取代 2-酮酸的动力学参数

Table 4 Kinetic parameters of wild-type and mutant H227Q on alkyl substituted 2-keto acids

底物 Substrate	Wild-type			H227Q		
	K_m (mmol/L)	k_{cat} (1/S)	k_{cat}/K_m (L/(mmol·s))	K_m (mmol/L)	k_{cat} (1/S)	k_{cat}/K_m (L/(mmol·s))
Pyruvic acid	15.62 ± 2.04	7.78 ± 0.28	0.50 ± 0.14	4.73 ± 0.95	22.30 ± 0.72	4.71 ± 0.78
2-ketobutyric acid	7.96 ± 1.04	2.96 ± 0.07	0.37 ± 0.07	15.87 ± 3.17	16.09 ± 0.86	1.01 ± 0.27
2-oxovaleric acid	8.07 ± 1.29	0.72 ± 0.02	0.09 ± 0.02	28.62 ± 2.36	7.15 ± 0.21	0.25 ± 0.09
2-ketoglutaric acid	12.63 ± 2.40	0.62 ± 0.03	0.05 ± 0.01	27.85 ± 5.93	6.54 ± 0.53	0.23 ± 0.09

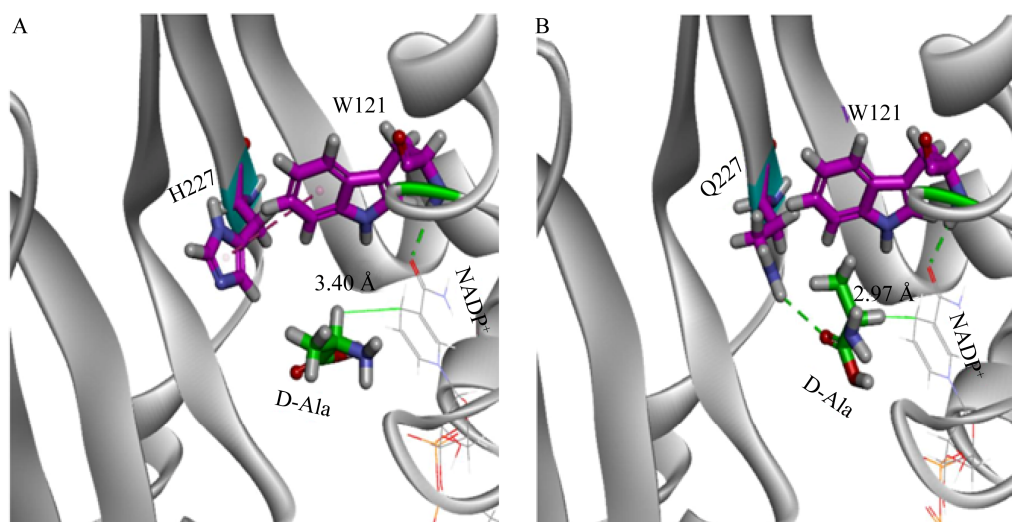


图 4 D-丙氨酸被对接到野生型和突变体蛋白的底物结合位点

Figure 4 D-alanine were docked into the substrate-binding site

注: A: D-丙氨酸在野生型酶中的位置; B: D-丙氨酸在 H227Q 突变体酶中的位置. 绿色的实线表示 D-丙氨酸的 α -氢原子到烟酰胺辅酶 $NADP^+$ 的 C4 原子之间的距离, 疏水相互作用和氢键显示为虚线.

Note: A: D-alanine posited in wild-type enzyme; B: D-alanine posited in mutant H227Q. Green line is distance between α -hydrogen atom of D-alanine and C4 of nicotinamide mononucleotide ($NADP^+$); Hydrophobic interactions and hydrogen bonds are shown as dotted lines.

看出,由于 227 位点的谷氨酰胺和丙氨酸的羧基上的羰基形成氢键, D-丙氨酸的甲基朝向发生了改变, D-丙氨酸的 α -H 与辅酶烟酰胺环 C4 原子之间的距离由野生型的 3.40 Å (图 4A)缩短为 2.97 Å (图 4B)。

H227Q 突变体提高酶活的可能原因是, 谷氨酰胺和底物羧基上的羰基形成氢键,使得底物的烷基侧链指向 W121 位点, 随着烷基侧链的延长, W121 位点的位阻效应越明显。因此, 在 H227 位点上进行 W121 位点突变才能进一步提高更长烷基侧链取代 2-酮酸底物的活力, 这与我们进行芳香族取代 2-酮酸底物的筛选时发现的结果一致。综上所述, 227 位的突变通过影响底物和周围氨基酸的相互作用, 改变底物催化取向以及底物 α -氢原子与烟酰胺核苷酸(NADP⁺) C4 之间的距离, 从而提高酶活性。

3 讨论与结论

通过定点饱和突变的方法获得了催化烷基取代 2-酮酸高活力的 StDAPDH 突变体。从实验结果可知, H227 位突变后对烷基取代 2-酮酸的催化活力发生了明显改变, 其中 H227Q 以及 H227N 对丙酮酸的催化活力提高最为显著, 分别提高了 10 倍和 8 倍。H227Q 是目前所报道的对丙酮酸和 2-酮戊二酸酶活(还原胺化方向)最高的突变体酶^[28,33]。通过动力学实验结果可知, 227 位突变为谷氨酰胺不仅增加了酶的转化数(k_{cat}), 并且增加了酶对底物的亲和力; 除了丙酮酸外, H227Q 对其他烷基取代 2-酮酸的催化活力均有不同程度的提高。

对野生型和突变体分别与 D-丙氨酸进行分子对接, 推测了酶对直链 2-酮酸比活力提高可能的催化机制。根据内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶催化的本质是发生在底物 α -C 上的氢和辅酶 NADP⁺ 的烟酰胺环 C4 之间, 因此, 二者之间的距离也被认为是决定酶催化效率高低的键。实验结果显示, 比活力提高的突变体相较于野生型, 均不同程度地缩小了两者之间的催化距离。这一结果为 StDAPDH

催化效率的提高提供了强有力的证据, 也进一步证明了底物结合口袋周围的氨基酸, 尤其是 227 位对酶的催化活力起到了非常重要的作用。同时, 本研究为接下来进行其他难催化底物合成对应 D-氨基酸工作的开展奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Martínez-Rodríguez S, Martínez-Gómez AI, Rodríguez-Vico F, et al. Natural occurrence and industrial applications of D-amino acids: an overview[J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2010, 7(6): 1531-1548
- [2] Strömstedt AA, Pasupuleti M, Schmidtchen A, et al. Evaluation of strategies for improving proteolytic resistance of antimicrobial peptides by using variants of EFK17, an internal segment of LL-37[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(2): 593-602
- [3] Kovacs M, Schally AV, Csernus B, et al. Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) antagonist Cetrorelix down-regulates the mRNA expression of pituitary receptors for LH-RH by counteracting the stimulatory effect of endogenous LH-RH[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(4): 1829-1834
- [4] Coward RM, Carson CC. Tadalafil in the treatment of erectile dysfunction[J]. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 2008, 4(6): 1315-1329
- [5] Xia Q, Huang YH, Lin X, et al. Highly sensitive D-alanine electrochemical biosensor based on functionalized multi-walled carbon nanotubes and D-amino acid oxidase[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2016, 113: 1-6
- [6] Snell EE, Guirard BM. Some interrelationships of pyridoxine, alanine and glycine in their effect on certain lactic acid bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1943, 29(2): 66-73
- [7] Deaton DN, Graham KP, Gross JW, et al. Thiol-based angiotensin-converting enzyme 2 inhibitors: P^S modifications for the exploration of the S^I subsite[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2008, 18(5): 1681-1687
- [8] Behrends M, Wagner S, Kopka K, et al. New matrix metalloproteinase inhibitors based on γ -fluorinated α -aminocarboxylic and α -aminohydroxamic acids[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2015, 23(13): 3809-3818
- [9] Ley SV, Priour A. Total synthesis of the cyclic peptide argyrisin B[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2002, 2002(23): 3995-4004
- [10] Shaginian A, Rosen MC, Binkowski BF, et al. Solid-phase synthesis of dihydrovirginiamycin S₁, a streptogramin B antibiotic[J]. *Chemistry-A European Journal*, 2004, 10(17): 4334-4340
- [11] Fraser BH, Mulder RJ, Perlmutter P. The total synthesis of

- pamamycin-607. Part 2: synthesis of the C6–C18 domain[J]. *Tetrahedron*, 2006, 62(12): 2857-2867
- [12] Farmer JJ, Attygalle AB, Smedley SR, et al. Absolute configuration of insect-produced epilachnene[J]. *Tetrahedron Letters*, 1997, 38(16): 2787-2790
- [13] Attygalle AB, Svatoš A, Veith M, et al. Biosynthesis of epilachnene, a macrocyclic defensive alkaloid of the Mexican bean beetle[J]. *Tetrahedron*, 1999, 55(4): 955-966
- [14] Lennox JR, Turner SC, Rapoport H. Enantiospecific synthesis of annulated nicotine analogues from D-glutamic acid. 7-Azabicyclo[2.2.1]heptano[2.3-c]pyridines[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2001, 66(21): 7078-7083
- [15] Ksander GM, Yuan AM, Diefenbacher CG, et al. Angiotensin converting enzyme inhibitors: N-substituted D-glutamic acid gamma-dipeptides[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1985, 28(11): 1606-1611
- [16] de Dios A, Prieto L, Martín JA, et al. 4-Substituted D-glutamic acid analogues: the first potent inhibitors of glutamate racemase (MurI) enzyme with antibacterial activity[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2002, 45(20): 4559-4570
- [17] Koeller KM, Wong CH. Enzymes for chemical synthesis[J]. *Nature*, 2001, 409(6817): 232-240
- [18] Hollmann F, Arends IWCE, Holtmann D. Enzymatic reductions for the chemist[J]. *Green Chemistry*, 2011, 13(9): 2285-2314
- [19] Bezsudnova EY, Popov VO, Boyko KM. Structural insight into the substrate specificity of PLP fold type IV transaminases[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(6): 2343-2357
- [20] Aganyants H, Weigel P, Hovhannisyan Y, et al. Rational engineering of the substrate specificity of a thermostable D-hydantoinase (Dihydropyrimidinase)[J]. *High-Throughput*, 2020, 9(1): 5
- [21] Wang RY, Li JF, Dang DY, et al. Bacterial production of maize and human serine racemases as partially active inclusion bodies for D-serine synthesis[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2020, 137: 109547
- [22] Martínez-Rodríguez S, Soriano-Maldonado P, Gavira JA. N-succinylamino acid racemases: enzymatic properties and biotechnological applications[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2020, 1868(4): 140377
- [23] Parmeggiani F, Casamajo AR, Colombo D, et al. Biocatalytic retrosynthesis approaches to D-(2,4,5-trifluorophenyl) alanine, key precursor of the antidiabetic sitagliptin[J]. *Green Chemistry*, 2019, 21(16): 4368-4379
- [24] Abbott SD, Lane-Bell P, Sidhu KPS. Synthesis and testing of heterocyclic analogs of diaminopimelic acid (DAP) as inhibitors of DAP dehydrogenase and DAP epimerase[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1994, 116(15): 6513-6520
- [25] 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]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1980, 255(10): 4487-4494
- [26] Jones H, Venables WA. Solubilisation of D-amino acid dehydrogenase of *Escherichia coli* K12 and its re-binding to envelope preparations[J]. *Biochimie*, 1983, 65(3): 177-183
- [27] Tanigawa M, Shinohara T, Saito M, et al. D-amino acid dehydrogenase from *Helicobacter pylori* NCTC 11637[J]. *Amino Acids*, 2010, 38(1): 247-255
- [28] 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]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(33): 10923-10929
- [29] Akita H, Doi K, Kawarabayashi 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[J]. *Biotechnology Letters*, 2012, 34(9): 1693-1699
- [30] Gao XZ, Chen X, Liu WD, et al. A novel meso-diaminopimelate dehydrogenase from *Symbiobacterium thermophilum*: overexpression, characterization, and potential for D-amino acid synthesis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(24): 8595-8600
- [31] Zhao LM, Liu WD, Chen X, et al. Effect of residue Y76 on co-enzyme specificity of meso-diaminopimelate dehydrogenase from *Symbiobacterium thermophilum*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2015, 31(7): 1108-1118 (in Chinese)
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[J]. *生物工程学报*, 2015, 31(7): 1108-1118
- [32] Liu WD, Li Z, Huang CX, et al. Structural and mutational studies on the unusual substrate specificity of meso-diaminopimelate dehydrogenase from *Symbiobacterium thermophilum*[J]. *ChemBioChem*, 2014, 15(2): 217-222
- [33] Cheng XK, Chen X, Feng JH, et al. Structure-guided engineering of meso-diaminopimelate dehydrogenase for enantioselective reductive amination of sterically bulky 2-keto acids[J]. *Catalysis Science & Technology*, 2018, 8(19): 4994-5002
- [34] Gao XZ, Huang F, Feng JH, et al. Engineering the meso-diaminopimelate dehydrogenase from *Symbiobacterium thermophilum* by site saturation mutagenesis for D-phenylalanine synthesis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(16): 5078-5081
- [35] Mayer KM, Arnold FH. A colorimetric assay to quantify dehydrogenase activity in crude cell lysates[J]. *Journal of Biomolecular Screening*, 2002, 7(2): 135-140
- [36] Hayashi J, Seto T, Akita H, et al. Structure-based engineering of an artificially generated NADP⁺-dependent D-amino acid dehydrogenase[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(11): e00491-17
- [37] Akita H, Hayashi J, Sakuraba H, et al. Artificial thermostable D-amino acid dehydrogenase: creation and application[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1760