

鲍曼不动杆菌 UDP-葡萄糖 4-差向异构酶 Gne1 的表征

张 展¹, 冯 雁¹, 李 谦^{2*}, 崔 莉^{1**}

(¹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;

²中国药科大学生命科学技术学院, 南京 210009)

摘要 异源表达鲍曼不动杆菌 AB0057 的 UDP-葡萄糖 4-差向异构酶并表征其酶学性质以及分析其结构与功能。将异构酶基因构建到 pET-28a 表达载体并在大肠埃希菌 BL21(DE3) 中异源表达, 使用高效液相色谱检测酶活力及表征酶学性质。系统发育分析、序列比对、同源建模与分子对接分析其结构与关键催化位点。结果显示, 重组酶 Gne1 获得可溶性表达, 质量约为 38.9 kD, 催化最适温度为 44 °C, 最适 pH 为 6.0, 米氏常数 K_m 与催化常数 k_{cat} 分别为 (1.227 ± 0.0824) mmol/L 和 $(82.64 \pm 3.562) \times 10^{-3} \cdot \text{min}^{-1}$ 。该酶属于 NADB_Rossmann 超家族并分属于 UDP_G4E_1_SDR_e 亚组, 分别具有典型 GXGXXG 基序与 YXXXX 基序。N 端结构域与 NAD 结合, 而 C 端结构域用来结合底物, 催化关键位点为 S125 和 Y150。本研究验证了 Gne1 的差向异构酶活性, 阐释了其序列特点和结构特征, 揭示了其与底物、辅因子的结合模式, 分析了关键催化位点。为蛋白质工程改造提高酶活力进而利用生物酶法合成稀有功能糖提供了理论依据。

关键词 差向异构酶; 酶学性质表征; 序列及结构分析; 稀有功能糖合成

中图分类号 Q558.1; Q71; Q814.1 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2021)06-0742-09

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20210613

引用本文 张展, 冯雁, 李谦, 等. 鲍曼不动杆菌 UDP-葡萄糖 4-差向异构酶 Gne1 的表征[J]. 中国药科大学学报, 2021, 52(6):742-750.

Cite this article as: ZHANG Zhan, FENG Yan, LI Qian, et al. Characterization of a UDP-glucose 4-epimerase from *Acinetobacter baumannii* [J]. *J China Pharm Univ*, 2021, 52(6):742-750.

Characterization of a UDP-glucose 4-epimerase from *Acinetobacter baumannii*

ZHANG Zhan¹, FENG Yan¹, LI Qian^{2*}, CUI Li^{1**}

¹State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Science and Technology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240;

²School of Life Science & Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract The purpose of this article is to express the UDP-glucose 4-epimerase from *Acinetobacter baumannii* AB0057, characterize its enzymatic properties and analyze its structure and function. The epimerase gene was constructed into pET-28a expression vector and heterologously expressed in BL21(DE3). Enzyme activity was assayed using high performance liquid chromatography. The structure and key residues were analyzed by phylogenetic analysis, sequence alignment, homology modeling and molecular docking. Results indicated that the recombinant enzyme Gne1 was expressed at a molecular weight of 38.9 kD, with an optimum temperature of 44 °C and an optimum pH of 6.0. Michaelis-Menten parameters K_m and k_{cat} were (1.227 ± 0.0824) mmol/L and $(82.64 \pm 3.562) \times 10^{-3} \cdot \text{min}^{-1}$, respectively. This enzyme belongs to NADB_Rossmann superfamily and UDP_G4E_1_SDR_e subgroup with typical GXGXXG and YXXXX sequence motifs. The N-terminal structural domain bound to NAD, while the C-terminal structural domain bound to substrate, and the catalytic key sites were S125 and Y150. The current work verified the epimerase activity of Gne1, explained its sequence and structural features, revealed its binding mode with substrates and cofactors, and analyzed the key residues, which provides

收稿日期 2021-04-22 通信作者 *Tel: 025-83220372 E-mail: leqean@163.com

**Tel: 021-34207248 E-mail: cui@sjtu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 21977067, No. 31770098, No. 31620103901); 国家重点研发计划项目资助(2018YFA0900702)

a basis for protein engineering to improve the epimerase activity and then use biological enzymatic method to synthesize rare functional sugars.

Key words epimerase; enzymatic property; sequence and structure analysis; synthesis of rare functional sugar

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21977067, No. 31770098, No. 31620103901) and the National Key R&D Program of China (No. 2018YFA0900702)

大多数构型的吡喃糖分子及其衍生物在自然界中较为稀有^[1]且具有广泛的生物活性谱,如D-阿洛酮糖可用作低卡路里甜味剂,同时具有血糖抑制、活性氧清除和神经保护等活性^[2],D-塔格糖具有低热量、降血糖、抗龋齿和抗肥胖等特性^[3-4],L-塔格糖可用作治疗半乳糖贮积症的分子伴侣药物米格斯他的起始原料^[5]。然而,化学合成稀有功能糖必须克服糖分子多手性中心的障碍,生物酶合成法为解决这个难题提供了方案,为更加便利高效精准地生产各种构型的稀有功能糖,日本香川大学教授 Izumori 等^[6]提出了可用来生产所有稀有糖的生物制备策略,即以廉价的单糖为原料,利用醛糖异构酶、D-塔格糖 3-差向异构酶等糖异构酶生产稀有功能糖,其中帮助糖分子实现羟基构型变化而生成稀有功能糖的是糖差向异构酶(EC 5. 1. 3. -),根据作用于糖分子手性中心位置的不同,其可以分为 C-1 差向异构酶,如醛糖 1-异构酶、C-2 差向异构酶(如 N-乙酰-D-葡萄糖胺 2-差向异构酶)和 C-3 差向异构酶(如 D-塔格糖 3-差向异构酶等)。

UDP-葡萄糖 4-差向异构酶(EC 5. 1. 3. 2)是作用于 UDP-葡萄糖或 UDP-半乳糖的 C-4 差向异构酶,能够特异性改变 4-羟基构型以实现两种底物相互转化。不同来源的 UDP-葡萄糖 4-差向异构酶对底物的杂泛性不同,据此可被分为 3 类:第 1 类是对 UDP-葡萄糖/UDP-半乳糖具有偏好性,第 3 类是对 UDP-N-乙酰葡萄糖胺/UDP-N-乙酰半乳糖胺均具有偏好性,如来自大肠埃希菌 O5:K4:H4 的 UDP-葡萄糖 4-差向异构酶显示出对乙酰化底物更高的活性^[7],而第 2 类是对两种底物均不具有偏好性^[8]。UDP-葡萄糖 4-差向异构酶具有诸多研究价值,例如,该酶参与的遗传疾病会导致严重的半乳糖血症^[9-10],该酶可参与致病细菌的主要致病因子脂多糖 O-抗原的生物合成,可参与链霉菌具有抗菌活性的次级代谢产物莫诺霉素的生成^[11],可参

与有价值的半乳糖基化产物的生物催化^[12]。此外,该酶还可被用来催化生成稀有功能糖, Kim 等^[13]利用来自大肠埃希菌的 UDP-葡萄糖 4-差向异构酶催化生成塔格糖,且通过对 UDP 基团附近的氨基酸进行饱和突变筛选,获得了对塔格糖催化能力提高的突变体,为稀有功能糖的合成开辟了新的方法和思路。然而这种催化能力还需进一步提高,为了达到这个目的,除了对这个酶本身进行改造,也可以通过选择与其具有一定相似性的不同来源的异构酶作为候选改造模板。

本研究对与大肠埃希菌 UDP-葡萄糖 4-差向异构酶进化关系较近的鲍曼不动杆菌 AB0057 来源的同工酶 Gne1 的酶学性质进行表征,通过序列比对、同源建模与分子对接等方法揭示了其与底物、辅因子的结合模式和催化机制,为蛋白质工程改造提高酶活力进而应用于稀有功能糖的生物合成提供理论依据。

1 材 料

1.1 菌株与质粒

UDP-葡萄糖 4-差向异构酶 Gne1 (GenBank: ACJ39545. 1) 来源于鲍曼不动杆菌 AB0057; 异源表达宿主大肠埃希菌 BL21 (DE3) 感受态细胞(北京全式金生物技术有限公司); UDP-葡萄糖 4-差向异构酶基因与表达载体 pET-28a (上海生工生物工程股份有限公司); T7 通用引物(北京擎科新业生物技术有限公司)。

1.2 主要试剂

PrimeSTAR Max Premix DNA 高保真聚合酶(日本宝日医公司); 限制性核酸内切酶(美国赛默飞世尔公司); 质粒 DNA 小量制备试剂盒(上海捷瑞生物工程有限公司); PCR 产物纯化试剂盒(美国康宁公司); PAGE 蛋白电泳凝胶制备试剂盒(西安晶彩生物科技有限公司); Bradford 蛋白质浓度测定试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司);

蛋白质亲和色谱介质 Ni NTA Bead 6FF(常州天地人和生物科技有限公司);超滤管 Amicon Ultra-15(美国默克公司);尿苷-5'-二磷酸葡萄糖二钠盐(uridine 5'-diphosphoglucose disodium salt, UDPG, 上海源叶生物科技有限公司);尿苷-5'-二磷酸半乳糖二钠盐(上海麦克林生化科技有限公司);其余试剂为市售分析纯。

1.3 培养基

LB 培养基: NaCl 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 固体培养基须再加入 2% 的琼脂糖。

1.4 仪器

Mastercycler PCR 仪(德国 Eppendorf 公司); Mupid-2plus 核酸电泳仪(日本 Mupid 公司); Mini-PROTEAN Tetra 蛋白电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); UH-06 高压匀质仪(永联生物公司); 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。

2 方法

2.1 目的基因的合成及验证

UDP-葡萄糖 4-差向异构酶与表达载体连接的酶切位点选择 *Nde* I 和 *Eco* R I, 并根据大肠埃希菌常用密码子对目的基因进行优化, 委托公司进行合成。合成的质粒与大肠埃希菌 BL21(DE3) 感受态细胞混匀后 42 °C 热激 90 s 转化, 加入 LB 培养基 800 μL 于 37 °C, 220 r/min 恒温摇床复苏 1 h。复苏后经 4 000 r/min 离心去上清液 600 μL, 剩余培养基重悬菌体后均匀涂布到含有 25 μg/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基上, 37 °C 倒置培养 12 h 后挑取单克隆转接到含有 25 μg/mL 卡那霉素 LB 液体培养基 5 mL 中, 同时使用 T7 通用引物对单克隆进行菌落 PCR 验证并送金唯智公司测序。转接后的 5 mL LB 液体培养基 37 °C, 220 r/min 培养 12 h 后提取质粒, 限制性核酸内切酶与质粒反应 1 h 后使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果。PCR 体系和程序以及酶切体系见表 1~表 2。

Table 1 PCR contents of *gne1*

Regents	Volume/μL
Forward primer (10 μmol/L)	1
Reverse primer (10 μmol/L)	1
PrimeSTAR Max premix (2 ×)	25
DMSO	5
ddH ₂ O	18

Table 2 Amplification conditions of *Gne1*

Temperature	Time	Cycle number
98 °C	5 min	
98 °C	10 s	
57 °C	5 s	35
72 °C	10 s	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

Table 3 Enzymatic digest of recombinant plasmid

Regent	Volume/μL
Plasmid	1
10 × Fast digest buffer	5
<i>Nde</i> I	2.5
<i>Eco</i> R I	2.5
ddH ₂ O	39

2.2 *Gne1* 重组酶的表达纯化

挑取测序正确的单克隆接种于含 25 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基 5 mL 中, 37 °C, 220 r/min 培养过夜, 将菌液(0.5% 接种量) 5 mL 转接于含 25 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基 1 000 mL 中, 37 °C, 220 r/min 培养至 *A*₆₀₀ 为 0.6~0.8(2~3 h), 加入 IPTG 至浓度为 1 mmol/L, 20 °C, 诱导 20 h。诱导结束后, 菌液经 5 000 r/min 离心 20 min 收集菌体, 加入 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH 8.0, 250 mmol/L NaCl) 80 mL 重悬, 使用高压细胞匀质仪破碎菌体。破碎完成后, 4 °C、10 000 r/min、30 min 离心 2 次, 收集上清液过 Ni 柱 2 次。使用洗涤液 1(30 mmol/L 咪唑、50 mmol/L Tris-HCl、250 mmol/L NaCl) 和洗涤液 2(50 mmol/L 咪唑、50 mmol/L Tris-HCl、250 mmol/L NaCl) 各 150 mL(30 倍 Ni 柱体积) 以洗脱杂蛋白, 使用 25 mL(5 倍 Ni 柱体积) 洗脱液(200 mmol/L 咪唑、50 mmol/L Tris-HCl、250 mmol/L NaCl) 洗脱目的蛋白并收集在离心管中。纯化出的酶经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳验证, 并转移至截流量为 10 kD 的超滤管中, 5 000 r/min 离心 20 min, 弃滤液, 向超滤管中加入 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH 8.0) 至最高限, 5 000 r/min, 20 min, 重复此步骤 5 次, 将浓缩液转移至 2 mL 离心管中, 加入少量甘油。使用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白质含量。

2.3 *Gne1* 重组酶的活性表征

2.3.1 酶活力检测 Tris-HCl(50 mmol/L, pH 8.0) 缓冲液的 100 μL 反应体系中包含 5 mg/mL 纯

化后的蛋白, 2 mmol/L 天然底物 UDP-葡萄糖, 37 °C 反应 1 h, 反应结束后沸水浴 3 min 使酶变性, 12 000 r/min 离心 30 min, 吸取上清液并使用 0.22 μm 滤膜过滤, 滤液使用高效液相色谱仪分析, 色谱柱为 Agilent SB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 分析柱, 流速为 0.8 mL/min, 乙酸三乙胺缓冲液 (40 mmol/L, pH 6.0) 等度洗脱, 柱温 25 °C, 进样量 5 μL, 紫外检测器设置波长为 262 nm, 分析时间为 15 min。

2.3.2 酶活力单位定义 44 °C, pH 6.0 条件下, 每分钟转化 1 μmol 底物所需要的酶量, 即 1 个酶活力单位, 以 U 表示。反应体系中的 UDP-葡萄糖浓度按照下式计算: $y = 2131.558x, R^2 = 0.999\ 97$, y 为紫外信号峰面积 (mAU×min), x 为反应体系中的 UDP-葡萄糖的浓度 (mmol/L)。酶活力 (mU/mg)

计算公式为: 酶活力 = $\frac{(x_0 - x)V}{t \cdot m} \times 10^6$, 其中, x_0 为反应前体系中 UDP-葡萄糖浓度 (mmol/L); t 为反应时间 (min), 60 min; m 为反应体系中酶的质量 (mg), 0.5 mg; V 为反应体积 (L), 1×10^{-4} L。

2.3.3 最适温度探究 在 pH 8.0 的条件下, 反应体系中 UDP-葡萄糖的浓度为 1 mmol/L, 温度梯度选择 16 °C、23 °C、30 °C、37 °C、44 °C、51 °C。

2.3.4 最适 pH 探究 在温度为 44 °C 条件下, 反应体系中 UDP-葡萄糖的浓度为 1 mmol/L, pH 梯度选择 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0, 其中 pH 梯度 5.0、6.0、7.0 使用 50 mmol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配制, pH 梯度 7.0、8.0、9.0 使用 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液配制, pH 梯度 9.0 和 10.0 使用 50 mmol/L Gly-NaOH 缓冲液配制。

2.3.5 动力学测定 在温度为 44 °C, pH 6.0 条件下, UDP-葡萄糖的浓度梯度为 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.4, 0.7, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 mmol/L。使用 Origin 软件对不同底物浓度对应的酶促反应速率进行 Michaelis-Menten 方程拟合即得到动力学参数 K_m 和 k_{cat} 。

2.4 Gne1 的进化、序列和结构分析

使用 MEGA 7.0 软件对 KEGG 数据库中选择 E. C. number 为 5.1.3.2、5.1.3.6 和 5.1.3.7 共 24 条蛋白序列与 GalE 序列进行比对, 比对参数选择默认值, 进化树构建方法选择邻接法, 自展值设置为 1 000, 进化距离由 p-distance 计算。在 NCBI 中

使用 Batch CD-search 分析该组序列的保守结构域及预测配体的结合位点。将进化关系较近的 Gne1 的蛋白序列在 NCBI 中进行 Blast 分析, 数据库选择 “PDB protein database”, 选择相似度较高 5 条蛋白序列与 Gne1 在 ClustalX2 中进行比对, 参数选择默认值, 比对结果使用 ESPript 3.0 软件进行着色, 二级结构模板使用来自大肠埃希菌的同工酶 (PDB: 1XEL, 相似度 55.2%)。

2.5 Gne1 的同源建模与分子对接

使用 Swiss Model 在线网站对 Gne1 的蛋白质序列同源建模, 使用大肠埃希菌的同工酶 (PDB: 1XEL, 相似度 55.2%) 作为模板, 构建好的模型上传至 SAVES v6.0 在线网站进行评估。使用 Pymol 软件对同源建模的 Gne1 与含有配体的模板分子进行比对, 得到含有配体分子的 Gne1, 使用 Discovery Studio 展示配体与 Gne1 的相互作用。

3 结 果

3.1 目的基因的合成及验证结果

T7 通用引物扩增的片段长度的理论值为 1 336 bp, 菌落 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳验证正确 (图 1, 序号 1-4)。提取重组质粒经 *Nde* I 和 *Eco* R I 双酶切后, 得到线性载体片段与目的基因片段 (图 1, 序号 5)。菌落 PCR 产物经纯化后送公司测序, 测序结果显示目的基因成功构建到载体上。

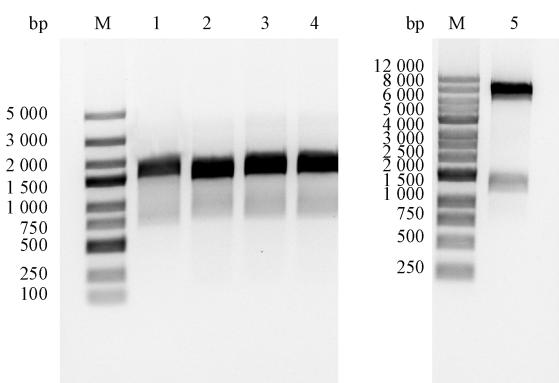


Figure 1 Colony PCR results and enzymatic digest verification
M: DNA ladder; 1-4: Colony PCR results; 5: Recombinant plasmid digested by restriction enzymes

3.2 重组酶 Gne1 的表达纯化结果

重组酶在 1 L 的 LB 培养基中经 1 mmol/L IPTG 20 °C 诱导 20 h 后, 离心去除培养基后得到湿菌体的质量为 44.5 g。重组酶质量约为 38.9 kD, 10%

SDS-PAGE电泳显示(图2),纯化的目标蛋白位于蛋白质分子量标准35 kD和45 kD之间,与预测值相符。另外,从细胞破碎液的电泳结果中可看出(图2,序号1),重组酶在细胞内正常表达,分析上清液可知该酶获得了可溶性表达,纯化液中重组酶浓度较高,该酶成功纯化,共获得重组酶85.2 mg,重组酶产率为1.91 mg/g。

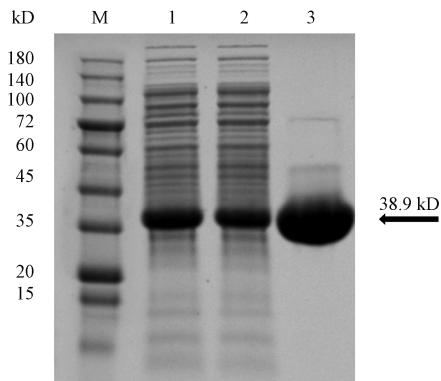


Figure 2 SDS-PAGE analysis of the recombinant enzyme
M: Protein marker; 1: Cell lysate; 2: Lysate supernatant; 3: Purified Gne1

3.3 重组酶Gne1性质表征

对重组酶Gne1的天然活性进行验证,以UDP-葡萄糖为底物,其标准品保留时间为13.0 min,与Gne1反应1 h后,检测到产物UDP-半乳糖生成,保留时间为11.5 min,与UDP-半乳糖标准品保留时间一致(图3),由此验证天然底物活性。

该酶的最适温度进行研究(图4-A)。设置温

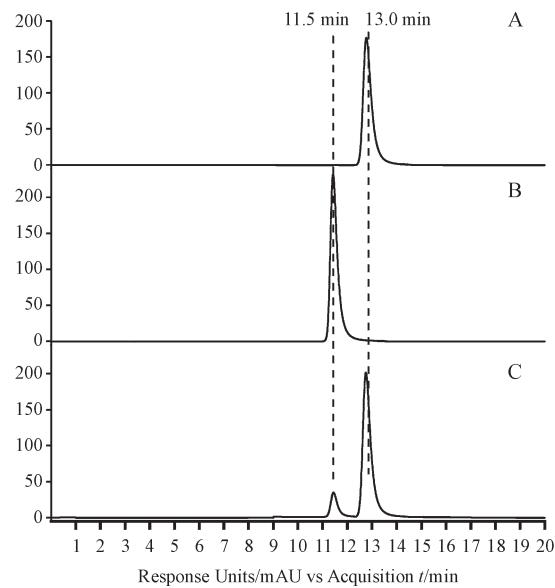


Figure 3 HPLC assay of Gne1 activity
A: UDP-glucose; B: UDP-galactose; C: UDP-glucose incubated with Gne1

度梯度的区间为16~51℃,7℃一个间隔,其在44℃时,酶活力达到最大,但是在该温度下,观察发现酶变性也较快,相比而言,37℃酶活力虽未达到最大,但在37℃下与天然底物反应1至数小时,均未发现蛋白沉淀产生,故37℃下的反应更为稳定。在温度为51℃时,活力急剧下降至10%。

酶的最适pH探究发现(图4-B),其活性在pH 6.0时活力达到最大,在pH 5.0时活力急剧下降到50%,在pH 7.0及pH 8.0时相对活力分别为75%及65%。

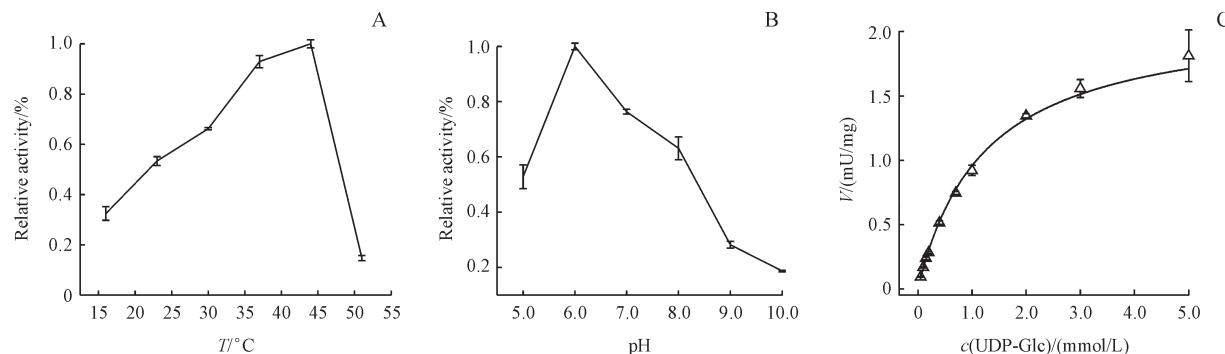


Figure 4 Optimal temperature, pH assay and kinetic parameters of Gne1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: Optimal temperature assay; B: Optimal pH assay; C: Kinetic parameters assay

根据得出的最适温度44℃和最适pH 6.0为反应条件再次反应,反应体系中底物初始浓度为3.0 mmol/L,计算酶比活力为 (1.558 ± 0.0697) mU/mg。

酶促反应动力学研究表明(图4-C),底物亲和常数 $K_M = (1.227 \pm 0.0824)$ mmol/L,最大反应速率 $v_{max} = (2.132 \pm 0.0919)$ mU/mg,转化数 $k_{cat} = 82.64 \pm 3.562 \times 10^{-3}$ min,催化效率 $k_{cat}/K_M = 61.69 \pm$

$4.597 \times 10^{-3} \text{ min}/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$ 。

3.4 重组酶 Gne1 的进化、序列和二级结构

选择来源于鲍曼不动杆菌 AB0057 的 UDP-葡萄糖 4-差向异构酶 (Genbank: ACJ39545.1) 进行表征, 一个重要的原因是其与研究较透彻的且显示出塔格糖催化活性的来自于大肠埃希菌的同工酶 (Genbank: NP_415280.3) 进化关系较近 (图 5-B), 它们的序列相似性达到 55.22%。为了更好地为蛋白质的改造做指导, 除了对异构酶进行表征外, 进化分析、序列分析和二级结构预测是必不可少的。

进化分析显示 (图 5-B), Gne1 属于 NADB-Rossmann 超家族。NADB 结构域存在于许多代谢途径如糖酵解的脱氢酶当中, 也存在于其他许多氧化还原酶中。由于异构酶催化过程中同样涉及

到氧化还原, 因此也需要 NAD 的参与, 故一些异构酶具有与 NAD 结合的结构域, Rossmann 折叠便是其中一种。该折叠的拓扑结构为, 第 1 个 β 折叠与其后的 α 融合处的氨基酸与 NAD 形成氢键, 特征序列为 GXGXXG, 异构酶 Gne1 的序列中同样具有这种特征, 如预测的二级结构中, β_1 与 α_1 之间的序列 GAGYIG。且序列比对结果 (图 5-A) 显示相应甘氨酸高度保守, 这也许是很多异构酶都具有的特征。此外, Gne1 还分属于 UDP_G4E_1_SDR_e 亚家族, 该亚家族作为短链脱氢酶家族的一员, 序列中含有的特征基序为 YXXXX, 从多序列比对结果看 Y 与 K 同样是完全保守的, 且被预测为关键催化残基, Gne1 中存在的该特征序列为 YGYTK。

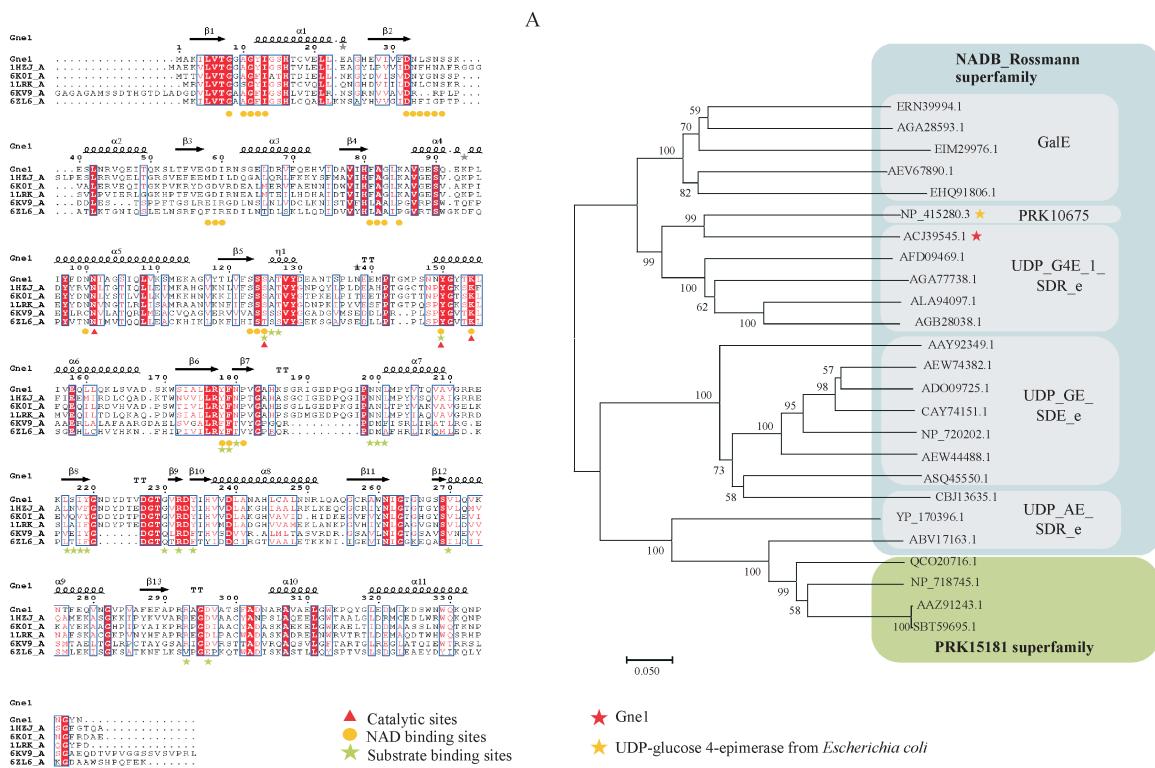


Figure 5 Bioinformatic analysis of Gne1 with its homologs

A: Multiple sequence alignments; B: Phylogenetic tree analysis

预测催化活性位点除了 Y150 和 K154 外, 还包括上游的 N101 及 S125。预测的 NAD 结合位点为 G8, A10, G11, Y12, I13, D32, N33, L34, S35, N36, S37, G58, D59, I60, F81, A82, G83, K85, N100, S123, S124, S125, Y150, K154, Y178, F179, P181。预测的底物结合位点为 S125, A126, T127, Y150,

Y178, F179, N180, N199, N200, L201, L216, S217, I218, Y219, G230, R232, Y234, V270, R293, D296。

二级结构预测结果显示, Gne1 蛋白包含 11 个 α 融合和 13 个 β 折叠。与 NAD 相互作用的二级结构涉及 7 个 β 折叠与 3 个 α 融合, 分布在 Gne1 的 N 端。与底物相互作用的二级结构涉及 5 个 β 折叠

和4个 α 螺旋,分布在Gne1的C端。关键催化氨基酸靠近序列中间位置,位于与NAD相互作用位点和与底物相互作用位点的交叠处。

3.5 重组酶Gne1的同源建模及分子对接

除了进化分析、序列分析和二级结构的研究,同源建模及分子对接可以揭示Gne1的结构特点,从而更加明确蛋白与配体的相互作用,对异构酶的改造作出更明确的指导。

以相似性较高的来自大肠埃希菌的异构酶(序列相似性为55.22%)为模板(PDB ID:1XEL)在Swiss Model网站对Gne1进行同源建模,对建模进行评估显示(图6-B),271(90.4%)个氨基酸落在主要允许区,25(8.6%)个氨基酸落在额外允许区,3(1%)个氨基酸落在可用允许区,落在非允许区的氨基酸数目为0。GMQE指标通常在0到1之间,

数值越高,表示建模的可靠性越高,结果显示建模的GMQE值较高为0.84。QMEAN指标在0附近表示模型结构与相似大小的实验结构之间具有良好的一致性,小于-4时则表明模型质量较低,建模的QMEAN值为-1.27,说明与相似大小实验结构的一致性较好。另外Overall quality factor的数值为95.4128,与高分辨率结构通常产生的数值相当。平均3D-1D score不低于0.2的残基比例为90.48%,达到80%的阈值。综合以上各项评价指标可以说明建模的质量较高,可以用于后续的分析。

同源建模结果显示(图6-A),单体亚基包含两个结构域,一个是靠近N端的NAD结合区域,另一个是靠近C端的底物结合区域,在两个区域的表面形成的裂隙成为催化的活性位点。

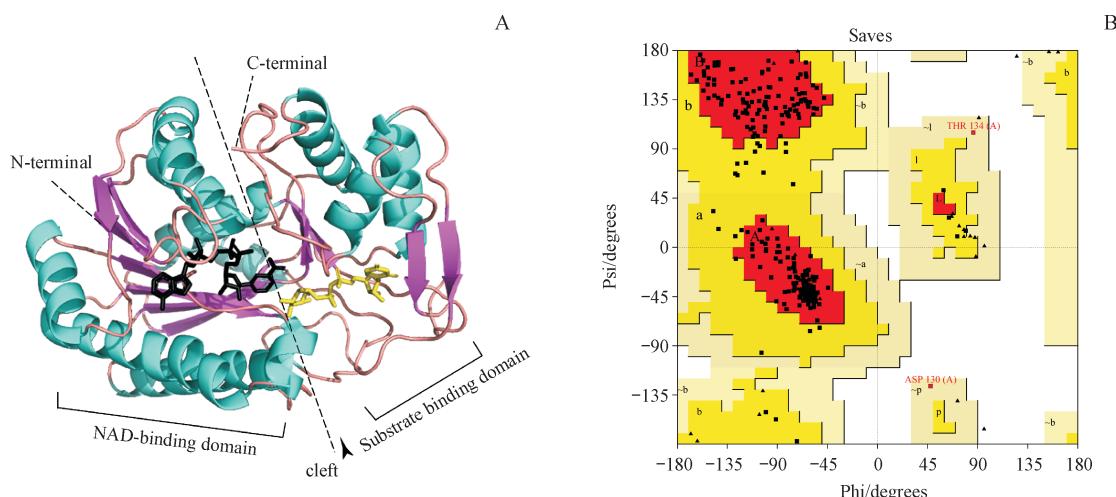


Figure 6 Homologous modelling structure and Ramachandran plot

A: Protein structure of Gne1 homologous modelling; B: Ramachandran plot of Gne homologous modelling

酶与配体的相互作用结果显示(图7),与NADH具有氢键相互作用的氨基酸为Tyr12,Ile13,Asp32,Asn33,Ser35,Asn36,Ser37,Asp59,Ile60,Asn100,Tyr150,Lys154。其中,Ile13,与烟酰胺核苷酸的磷氧形成氢键,Asp32,与腺嘌呤核糖同时形成两个氢键,Tyr150和Lys154分别与烟酰胺核糖形成氢键,这四个位点在序列比对中显示出完全的保守性。另外,Lys85与两个磷酸基团分别形成盐桥,帮助锚定NAD,除了6KV9和6ZL6这两种分别来自链霉菌和蜡状芽孢杆菌的以UDP-葡萄糖醛酸为底物的C-4差向异构酶的序列外,在参与比对的UDP-葡萄糖4-差向异构酶的序列中均完全保守。

与底物UDP-葡萄糖的结合具有重要作用的氨基酸包括Ser125,Asn180,Asn200,Leu201,Ser217,Try219,Asp296。Ser125与葡萄糖的4-羟基紧密接触,距离仅为2.55 Å,除了来自蜡状芽孢杆菌里的蛋白,该位点完全保守,推测其为催化关键位点。Asn180分别与葡萄糖6-羟基和 β -磷氧形成氢键,除了链霉菌和蜡状芽孢杆菌的蛋白,该位点完全保守。Arg232和Arg293,分别 β -磷氧与 α -磷氧形成氢键及盐桥,前者完全保守,后者除蜡状芽孢杆菌的蛋白外完全保守。Asp296与腺嘌呤核糖的2-羟基形成氢键,除蜡状芽孢杆菌的蛋白,该位点严格保守。

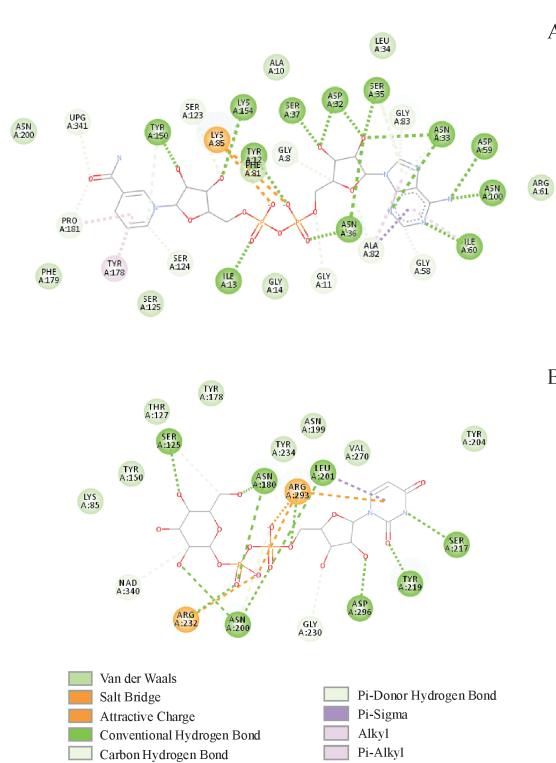


Figure 7 Interaction with ligands in Gne1

A: Interaction with NAD; B: Interaction with substrate

4 讨 论

本研究对来源于鲍曼不动杆菌的 UDP-葡萄糖 4-差向异构酶进行了表征并对与配体结合及催化的相关氨基酸进行了探究。Gne1 在大肠埃希菌 BL21 (DE3) 中获得可溶性表达, 并显示出对于天然底物 UDP-葡萄糖的催化活力, 其最适温度和 pH 分别为 44 °C 和 pH 6.0, 底物浓度为 3.0 mmol/L 时测得其酶比活力为 (1.558 ± 0.0697) mU/mg, 米氏常数 K_m 与催化常数 k_{cat} 分别为 (1.227 ± 0.0824) mmol/L 和 $(82.64 \pm 3.562) \times 10^3$ min, Gne1 虽与来自大肠埃希菌的同工酶具有 55.2% 的相似性, 然而动力学特征存在差别, 后者的动力学参数 K_m 与 k_{cat} 分别为 225 $\mu\text{mol/L}$ 与 760 s^{-1} ^[14-16]。这种亲和力与转换数的较大差距表明 Gne1 可能更适用于改造提升塔格糖催化活性。因为 UDP-葡萄糖与塔格糖在结构上存在差别——UDP 基团, 在改造提升对塔格糖的催化活性时, 也许需要适当缩小底物口袋或者减小与 UDP 的相互作用等, 客观上也会造成酶与 UDP-葡萄糖亲和力降低的结果。此外, 改造还需进一步考量酶与配体 NAD 及 UDP-葡萄糖

的相互作用以及关键催化氨基酸。

异构酶通常与 NAD 具有非常高的亲和力, 纯化出的酶一般都含有完整的 NAD, 其可在浓盐酸胍中变性而后从酶中分离出来^[17]。NAD 在实现异构酶催化活性的过程中非常关键, 底物吡喃糖 4-羟基氢被催化碱提取并被转移至 NAD 形成 NADH。Gne1 序列分析结果也显示, 其属于 NADB_Rossmann 超家族, 该家族的特点是具有能够与 NAD(P)/NAD(P)H 结合结构域, Gne1 也存在这种结构域的特征 GXGXXG, 序列为 GAGYIG, 此外, 底物对接后相互作用分析显示, 与 NAD 形成氢键相互作用的氨基酸多达 12 个, 盐桥 2 个, 其中还有高度保守的氨基酸 Tyr150 和 Lys154, 这两个氨基酸也属于 NADB_Rossmann 超家族中的亚家族——短链脱氢酶家族的特征氨基酸, 序列形式一般为 YXXXK。Lys154 的 ϵ -氨基通过与烟酰胺核糖核环的 4-羟基进行氢键作用, Lys154 在被突变为 Met 后, 酶与 NAD 的结合明显减弱, 因而该位点对 NAD 的结合做出重要贡献^[18], 另外 Asp32 与腺嘌呤核糖 2-羟基和 3-羟基同时形成 2 个氢键, 且在序列比对中显示完全保守, 推测其对于 NAD 的结合也是十分重要的。如此多的相互作用和关键位点的高度保守性也解释了 NAD 与 Gne1 具有高度亲和力以至于无需在反应体系中额外添加辅酶的原因。

Gne1除了其N端与NAD结合的结构域外,还有一个用于与底物UDP-葡萄糖结合的较小的C端结构域。与NAD相比,该结构域中与底物相互作用形成氢键的氨基酸仅有7个,形成盐桥的有2个,其他相互作用均比NAD少。其中,与UDP形成氢键相互作用的氨基酸有6个,而与吡喃糖相互作用的氨基酸仅有2个,与UDP结合作用强而与吡喃糖结合作用较弱,这反映了在催化过程中,UDP基团对吡喃糖起到重要的定位作用,因此其对吡喃糖4-羟基构型的催化特异性可能是由于UDP基团的正确定位产生的,同时作用力的减弱也增加了底物的活动性。对大肠埃希菌来源的同工酶晶体结构研究表明,UDP-葡萄糖, UDP-甘露糖, UDP-4-脱氧-4-氟-葡萄糖和 UDP-4-脱氧-4-氟-半乳糖在吡喃糖基结合位点中,吡喃糖的取向是不同的^[19]。另外在与 UDP-半乳糖的晶体结构研究中显示,与 UDP-葡萄糖相比,吡喃糖的构象发生了较大的翻转,这些研究均充分证实了在活性位点,羟基氢被

催化碱提取接着被转移至 NAD 形成 NADH 后, 形成的 4-酮基吡喃糖中间体发生了翻转, 使氢从 NADH 返回到吡喃糖的另一面, 实现吡喃糖 4-羟基构型的变化^[20]。在 Gne1 中, 催化构型变化的关键氨基酸极有可能为 Ser125, 在序列比对中, 其与结构功能已知的大肠埃希菌的同工酶活性位点 Ser124 相对应, 且该位点高度保守。并且 Gne1 与配体的相互作用显示, Ser125 与葡萄糖的 4-羟基形成氢键, 距离仅为 2.55 Å。

然而, 除了 Ser125, Tyr150 可能也参与到了催化作用中, 在一些研究中表明, Tyr 提供了一般酸碱催化的驱动力, 与 Ser 在介导质子转移中起着重要作用。这两个位点的双重突变 Tyr149Phe/Ser124Ala-GalE 的最大活性仅为野生型的千分之一, 单点突变后的活性为野生型的千分之一以下^[16], 并且这种突变并未影响到空间结构, 因此突变后造成的影响是动力学性质的。Gne1 与配体的相互作用显示 Tyr150 与烟酰胺核糖 2-羟基存在氢键, 而与吡喃糖仅存在范德华力, 虽然在实际催化过程中其距离吡喃糖 4-羟基的距离可能会更近^[21], 但具体的作用有待通过 Gne1 与底物的晶体结构研究进一步阐明。

References

- [1] Granstrom TB, Takata G, Tokuda M, et al. Izumoring: a novel and complete strategy for bioproduction of rare sugars [J]. *J Biosci Bioeng*, 2004, **97**(2): 89-94.
- [2] Mu WM, Zhang WL, Feng YH, et al. Recent advances on applications and biotechnological production of D-psicose [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, **94**(6): 1461-1467.
- [3] Kim P. Current studies on biological tagatose production using L-arabinose isomerase: a review and future perspective [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **65**(3): 243-249.
- [4] Oh DK. Tagatose: properties, applications, and biotechnological processes [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **76**(1): 1-8.
- [5] Jenkinson SF, Fleet GW, Nash RJ, et al. Looking-glass synergistic pharmacological chaperones: DGJ and L-DGJ from the enantiomers of tagatose [J]. *Org Lett*, 2011, **13**(15): 4064-4067.
- [6] Izumori K. Izumoring: a strategy for bioproduction of all hexoses [J]. *J Biotechnol*, 2006, **124**(4): 717-722.
- [7] Zhu HM, Sun B, Li YJ, et al. KfoA, the UDP-glucose-4-epimerase of *Escherichia coli* strain O5:K4:H4, shows preference for acetylated substrates [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, **102**(2): 751-761.
- [8] Ishiyama N, Creuzenet C, Lam JS, et al. Crystal structure of WbpP, a genuine UDP-N-acetylglucosamine 4-epimerase from *Pseudomonas aeruginosa*: substrate specificity in udp-hexose 4-epimerases [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279**(21): 22635-22642.
- [9] Frey PA. The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose [J]. *FASEB J*, 1996, **10**(4): 461-470.
- [10] Holden HM, Rayment I, Thoden JB. Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278**(45): 43885-43888.
- [11] Ostash B, Doud EH, Lin C, et al. Complete characterization of the seventeen step moenomycin biosynthetic pathway [J]. *Biochemistry*, 2009, **48**(37): 8830-8841.
- [12] Song HB, He M, Cai ZP, et al. UDP-glucose 4-epimerase and β -1, 4-galactosyltransferase from the oyster *Magallana gigas* as valuable biocatalysts for the production of galactosylated products [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, **19**(6): 1600-1610.
- [13] Kim HJ, Kang SY, Park JJ, et al. Novel activity of UDP-galactose-4-epimerase for free monosaccharide and activity improvement by active site-saturation mutagenesis [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2011, **163**(3): 444-451.
- [14] Wilson DB, Hogness DS. The enzymes of the galactose operon in *Escherichia coli*. I. purification and characterization of uridine diphosphogalactose 4-epimerase [J]. *J Biol Chem*, 1964, **239**: 2469-2481.
- [15] Swanson BA, Frey PA. Identification of lysine 153 as a functionally important residue in UDP-galactose 4-epimerase from *Escherichia coli* [J]. *Biochemistry*, 1993, **32**(48): 13231-13236.
- [16] Liu Y, Thoden JB, Kim J, et al. Mechanistic roles of tyrosine 149 and serine 124 in UDP-galactose 4-epimerase from *Escherichia coli* [J]. *Biochemistry*, 1997, **36**(35): 10675-10684.
- [17] Liu Y, Vanhooke JL, Frey PA. UDP-galactose 4-epimerase: NAD⁺ content and a charge-transfer band associated with the substrate-induced conformational transition [J]. *Biochemistry*, 1996, **35**(23): 7615-7620.
- [18] Frey PA, Hegeman AD. Chemical and stereochemical actions of UDP-galactose 4-epimerase [J]. *Acc Chem Res*, 2013, **46**(7): 1417-1426.
- [19] Thoden JB, Hegeman AD, Wesenberg G, et al. Structural analysis of UDP-sugar binding to UDP-galactose 4-epimerase from *Escherichia coli* [J]. *Biochemistry*, 1997, **36**(21): 6294-6304.
- [20] Thoden JB, Holden HM. Dramatic differences in the binding of UDP-galactose and UDP-glucose to UDP-galactose 4-epimerase from *Escherichia coli* [J]. *Biochemistry*, 1998, **37**(33): 11469-11477.
- [21] Thoden JB, Frey PA, Holden HM. Molecular structure of the NADH/UDP-glucose abortive complex of UDP-galactose 4-epimerase from *Escherichia coli*: implications for the catalytic mechanism [J]. *Biochemistry*, 1996, **35**(16): 5137-5144.