第33卷 第1期 2018年2月



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20160174

紫红红球菌 9 α —羟化酶 loop 对酶活性的影响

刘 扬,申雁冰,王九彬,王 敏

(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,天津科技大学生物工程学院,天津 300457)

摘 要: 3-甾酮-9α-羟化酶是转化雄甾-4-烯-3,17-二酮生成 9α-羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮的关键酶,其加氧酶组 分在底物进入酶活性中心入口处,存在一个由 16 个氨基酸构成的柔性 loop. 为了明晰 loop 对酶活性的影响,利用定 点突变技术对 loop 上结构变化较大的氨基酸进行研究,解析出了各氨基酸的作用,T224、N225、Y226 与周围α5 螺旋 和 β 折叠存在一定相互作用,共同调节底物通道与底物运送能力;D227 和 D228 起到支撑固定 loop 结构的作用,使 T224-Y226 能与其周围的氨基酸产生相互作用. 这为进一步采用蛋白质工程改造 9α-羟化酶提供了理论依据. 关键词: 3-甾酮-9α-羟化酶; 雄甾-4-烯-3,17-二酮; 9α-羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮; loop; 定点突变 中图分类号: Q71 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2018)01-0014-06

Influence of Loop on *Rhodococcus rhodochrous* 9α-Hydroxylase Activity

LIU Yang, SHEN Yanbing, WANG Jiubin, WANG Min

(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)

Abstract: 3-ketosteroid-9 α -hydroxylase is the key enzyme that transforms androst-4-ene-3, 17-dione into 9 α -hydroxylandrost-4-ene-3, 17-dione. There exists a flexible loop which consists of 16 amino acids in front of the entrance of the active center of its oxygenase component. To understand the influence of the loop on the enzyme activity, site-directed mutagenesis was used to investigate the amino acids of the loop which moved remarkably in the whole protein structure. As a result, T224, N225 and Y226 were learned to adjust the substrate channel and transport the substrate with their surrounding α 5-helix and β -sheet amino acids, while D227 and D228 played cerlain roles in supporting and fixing the loop, allowing T224-Y226 to interact with their surrounding amino acids. This work provided theoretical foundations for further research on 9 α -hydroxylase modification through protein engineering.

Key words: 3-ketosteroid-9*a*-hydroxylase; androst-4-ene-3, 17-dione; 9*a*-hydroxyandrost-4-ene-3, 17-dione; loop; sitedirected mutagenesis

雄甾-4-烯-3,17-二酮(androst-4-ene-3,17-dione, AD) 是合成甾体激素类药物的关键中间体,它的 9 α 羟基化产物9 α -羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮(9 α -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione,9 α -OH-AD) 是生产 9 α 位上有卤素的多种皮质激素的重要前体^[1].能够进 行 9 α -羟化的微生物有很多,目前应用较多的菌种是 红球菌(*Rhodococcus* sp.)和分枝杆菌(*Mycobacterium* sp.).3-甾酮 –9 α -羟化酶(3-ketosteroid-9 α -hydroxylase, KSHAB)负责将 AD 转化生成 9 α -OH- AD,由末端加氧酶(KSHA)与铁硫还原酶(KSHB)双 组分构成.

羟化酶的加氧酶组分 KSHA 在底物进出酶活性 中心出口处,存在一个 loop,像一个"开关",将底 物阻挡在活性中心通道外^[2].在本课题组前期对分枝 杆菌转化植物甾醇生成 AD 的研究中发现,分枝杆菌 (*Mycobacterium neoaurum*)TCCC11028 的 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶靠近底物活性中心处的 loop 上的 Ser138 突变成性质不同的氨基酸 Leu138 后,显著影响了该

收稿日期: 2016-05-18; 修回日期: 2016-08-12

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21276196,21406167)

作者简介:刘 扬(1986—),女,辽宁沈阳人,博士研究生;通信作者:王 敏,教授,minw@tust.edu.cn

酶对 AD 的活性^[3]. 已有文献证明柔性 loop 的开关运动是调控酶催化作用的关键因素,比如磷酸丙糖异构酶与脂肪酶的晶体结构研究表明,柔性 loop 作为"开关"调节底物进入活性位点,进而影响酶对底物的活性^[4-6].

尽管目前有 2 个 KSHA 的蛋白晶体结构得到解 析,但是KSHA 的loop与酶活性之间的关系尚不清楚. 本研究以已知晶体结构的紫红红球菌(*Rhodococcus rhodochrous*)DSM43269 的 KSHA5 loop 为研究对 象,应用定点突变技术探究 loop 对酶活性的影响,解 析各氨基酸对 loop 开关运动、调节底物通道的重要 性,研究成果加深对 9α-羟化酶的认识有着重要意 义,同时也为进一步研究其催化机理、改造酶蛋白活 性提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒与培养基

紫 红 红 球 菌 (*Rhodococcus rhodochrous*) DSM43269 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α、BL21 (DE3) 均由 本实验室保存.

质粒 pGEM-T Easy 购自 Promega 公司, 质粒 pET-28a(+)由本实验室保存.

LB 培养基(g/L):蛋白胨 10,酵母提取物 5, NaCl 10,pH 7.5. 固体培养基在此基础上添加 2% 的 琼脂粉.

1.1.2 试剂

限制性内切酶(*Nco* I、*Hind* Ⅲ和 *Dpn* I), NEB 公司;蛋白质 Marker, 北京全式金公司; TaKaRa LA *Taq*TM with GC Buffer、DNA Marker, Takara 公司; KOD Plus, Toyobo 公司; T4 连接酶, Promega 公司; 质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒、基因组提取试剂 盒, Omega Bio-Tek 公司; 其他药品和试剂均为分 析纯.

1.2 KSHA 氨基酸比对与蛋白结构

不同类型的 KSHA 蛋白的氨基酸序列用 Clustal X 比对.

KSHA5 无底物的 3D 结构(4QDF)与有底物 AD 的 3D 结构(4QDC)从 Protein Data Bank 数据库下载,用 Discovery Studio 2.5 软件分析有无底物存在时 KSHA5 的结构.

1.3 表达载体的构建

根据 KSHAB 的末端加氧酶 kshA5 与铁硫还原 酶 kshB 基因设计特异性引物,引入 Nco I 和 Hind Ⅲ 两个酶切位点, kshA5 的上、下游引物分别为kshA5-T-F1:5'-<u>CCATGG</u>TGTCCATCGACACCGCACGG-3', kshA5-T-R1:5'-<u>AAGCTT</u>GGGGGTCGCGGGTGGAGC C-3'; kshB 的上、下游引物分别为 kshB-T-F1:5'-<u>CCATGG</u>TGACAGCCGTCCAGGCACC-3', kshB-T-R1:5'-<u>AAGCTT</u>GAACTCGATGCGCACGTGGT-3' (其中标注下划线的碱基为添加的酶切位点).

提取 *R. rhodochrous* DSM43269 基因组作为扩 增模板,扩增羟化酶 *kshAB* 基因序列. PCR 反应体 系(50 µL):基因组模板 1 µL, 2×GC Buffer I 25 µL, 2.5 mmol/L dNTPs 8 µL, LA *Taq* DNA 聚合酶 0.5 µL, 10 µmol/L 上、下游特异性引物各 2 µL, ddH₂O 补齐至 50 µL.反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s, 60 ℃ 45 s, 72 ℃ 2 min, 30 个循环;72 ℃ 10 min.将 PCR 产物进行回收纯化,与 pGEM-T Easy 载体连接并送金唯智公司测序,测序正确后,经酶 切、连接获得表达载体 pET28-*kshA5* 与 pET28*kshB*. 胶回收纯化、酶切与连接等参照试剂说明书.

1.4 loop 上氨基酸的定点突变

以重组表达载体 pET28-kshA5 为模板,采用全质 粒 PCR 的方法进行突变子的构建, R217 的上、下游 突变引物分别为 TB_{R217A}-F: 5'-ACCGGTGCGGAGG ACGTCATCTCCG-3', TB_{R217A}-R: 5'-GTCCTCCGCA CCGGTCGAGTGCAT-3'; T224 的上、下游突变引物 分别为 TB_{T224V}-F: 5'-TCCGGCGTGAACTACGACG ACCCCAAC-3', TB_{T224V}-R: 5'-GTAGTTCACGCCGG AGATGACGTCC-3'; N225 的上、下游突变引物分别 为 TB_{N225L}-F: 5'-GGCACCCTGTACGACGACCCCA ACG-3', TB_{N225L}-R: 5'-GTCGTACAGGGTGCCGGA GATGACG-3'; Y226 的上、下游突变引物分别为 TB_{Y226F}-F: 5'-ACCAACTTTGACGACCCCAACGCC G-3', TB_{Y226F}-R: 5'-GTCGTCAAAGTTGGTGCCGGA GATGACG-3'; D227 的上、下游突变引物分别为 TB_{D2278}-F: 5'-AACTACAGCGACCCCAACGCCGAA C-3', TB_{D2278}-R: 5'-GGGGTCGCTGTAGTTGGTGCC GGAGATG-3'; D228 的上、下游突变引物分别为 TB_{D2285}-F: 5'-TACGACAGCCCCAACGCCGAACTG C-3', TB_{D2288}-R: 5'-GTTGGGGGCTGTCGTAGTTGGT GCCGGAG-3'(其中斜体部分的碱基为突变位点). PCR 反应体系(50 μL): pET28-KSHA5 模板 1 μL, $10 \times$ buffer for KOD plus 5 µL, dNTP mixture 6 µL,

KOD plus 1 µL, 25 mmol/L MgSO₄ 3 µL, 10 µmol/L 上、下游特异性引物各 2 µL, ddH₂O 补齐至 50 µL.反应条件: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 45 s, 68 ℃ 7 min, 25 个循环; 68 ℃ 10 min.反应完毕 后,直接向 PCR 的反应体系中添加限制性内切酶 *Dpn* I 及其 buffer, 37 ℃消化模板 2 h, 取 10 µL 消化 液转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中.挑取阳性克 隆,测序正确后,转化 *E. coli* BL21 感受态细胞,得到 各突变体的工程菌.

1.5 蛋白的诱导表达与纯化

挑取阳性克隆单菌落接种于 5 mL 含 50 µg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 ℃、200 r/min 过夜 培养.取培养液按体积比 1:50 转接于 50 mL 含 50 µg/mL 卡纳霉素的 LB 液体培养基中, 37 ℃、 200 r/min 培养, 表达 KSHA5(或其突变体)蛋白的菌 液培养至 $A_{600} = 0.4 \sim 0.6$, 表达 KSHB 蛋白的菌液长 至 $A_{600} = 0.2$, 加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L, 30 ℃、200 r/min 继续培养 24 h.

分别收集含 KSHA5(或其突变体蛋白)与 KSHB 的重组大肠杆菌菌体,加入破碎缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4),500 mmol/L NaCl,20 mmol/L 咪 唑,0.1 mmol/L EDTA)彻底洗去培养基,再用破碎缓 冲液重浮菌体,使各突变体细胞浓度保持一致.按体 积比 1:2 取 KSHA5(或突变体)细胞悬浮液与 KSHB 细胞悬浮液,充分混匀,超声破碎细胞 17 min(功率 32%,工作 5 s,间隔 5 s).蛋白纯化的 过程参见文献[7].纯化出的蛋白不需要透析(因为透 析也会使蛋白的活性受到损失),用 Bradford 法定量 总蛋白,并用软件 Quantity One 分析确定 KSHA 与 KSHB 含量的比值,通过添加纯 KSHB 蛋白调整各 突变蛋白与 KSHB 的含量比为 4:1.

1.6 蛋白活性测定

KSHAB 以 NADH 为辅酶,将来自 NADH 的电 子最终传递到 O₂,使底物被羟化.可以通过检测 340 nm 下 NADH 被氧化时吸光度的变化表征 KSHA5 及其各突变体的活性,摩尔吸光系数 ε 采用 6.22 mmol/(L·cm).酶活力单位定义为 1 min 氧化 1 nmol NADH 所需要的酶量.KSH 测定体系为含终 浓度为 105 µmol/L 的 NADH 和 250 µmol/L 的底物 AD(溶于 100% 异丙醇)的 200 µL 酶液.测定时,先 向酶标板中加入198 µL 蛋白酶液(质量浓度为 60 µg/ mL)和 1 µL NADH 溶液(母液浓度为 21 mmol/L), 最后加入 1 µL 的底物(母液浓度为 50 mmol/L),启 动反应,在酶标仪上(33 ℃)实时监测反应.

2 结果与分析

2.1 蛋白分析与突变位点的选择

首先对 *R. rhodochrous* DSM43269 的 5 个不同 类型 KSHA 的氨基酸进行了比对,结果如图 1 所示.

KSHA1	MSLGTSFOSETRETVAGSAPAREARGWHCLGLAKDEKDGKPHSVHAEGTKLVVWA
KSHAS	MSTDTARSGSDDDVFTRFTQAAAAPTRFARGWHCLGLI RDRODGKPHSTFAFGTKI VVFA
KCHY3	
KCHYA	MAGINELOVOLINTA ANOMICLOLONITADOM HAVEA OTALIVIA
KCUY0	MITTELATOR ACCEPTING THE INCLUSION ADDRESS
V2H45	MG51D1EDQVR11DVG1PPERIARGWHCLGLVRDFADGAPHQVDAFG15LVVPA
	::* * . *:*******:** : * ****** : ***.***:*
VOIIA 1	
ROUNE	DSNDEIRILDAICRINGGDLOGGI VRGDEIACFF HDWRWGGNGRGRGRGRNIF I ARRYFFIAR I
CAHCA	DSRGQLNVLDATCRHMGGDLSRGEVRGDSTACFFHDWRWNGRGRCTDTFTARRVFFTART
KSHA3	DSNGEPKVLDATCRHMGGDLSQGEIKGDSVACPFHDWRWGGNGKCIDIPTARRVPPLARI
KSHA4	DIAGKLHVLDAFCRHMGGNLARGEIKGDIIACPFHDWRWNGQGRCEAVPYARRIPKLGRI
KSHA2	GEDGKLNVLDAYCRHMGGNLAQGSVKGNTIACPFHDWRWRGDGKCAEIPYARRVPPLART
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
KSHA1	KAWHILDQDGLLFVWHDPQGNPPPADVIIPRIAGAISDEWIDWVWYIIEVD-INCREIID
KSHA5	RAWITLERNGQLYVWNDPQGNPPPEDVTIPEIAGYGTDEWTDWSWKSLRIKGSHCREIVD
KSHA3	RSWITMEKHGQLFVWNDPEGNTPPPEVTIPEIEQYGSDEWTDWTWNQIRIEGSNCREIID
KSHA4	KAWTTMERNGVLFVWHCPQGSEPTPELAIPEIEGYEDGQWSDWTWTTIHVEGSHCREIVD
KSHA2	RTWPVAEVSGQLFVWHDPQGSKPPAELAVPEVPTYGDPGWTDWVWNSIEVTGSHCREIVD
	::* . : * *:**: *:*, *. ::::*.: *:** * .: ::*****
KSHA1	NIVDMAHFFYVHYSFPVYFKNVFEGHVASQFMRGGAREDTRPHANGQPKMIGSRSDASYF
KSHA5	NVVDMAHFFYIHYSFPRYFKNVFEGHTATQYMHSTGREDVISGTNYDDPNAELRSEATYF
KSHA3	NVVDMAHFFYIHYAFPTFFKNVFEGHIAEQYLNTFGRPDKGMATQYG-LESTLESYAAYY
KSHA4	NVVDMAHFFYVHFQMPEYFKNVFDGHIAGQHMRSYGRDDIKTGVQMDLPEAQTISDAFYY
KSHA2	NVVDMAHFFYVHYGMPTYFRNVFEGHTATQVMRSLPRADAVGVSQATNYSAESRSDATYY
	*:******:*: :* :*:*** * * :. * * . : * * * ::
	100p
KSHA1	GPSFMIDDLVYEYEGYDVESVLINCHYPVSQDKFVLMYGMIVKKSDRLEGEKALQTAQ
KSHA5	GPSYMIDWLESDANGQTIETILINCHYPVSNNEFVLQYGAIVKKLPGVSDEIAAGMAE
KSHA3	GPSYMINPLKNNYGGYQTESYLINCHYPITHDSFMLQYGIIVKKPQGMSPEQSDVLAA
KSHA4	GPSFMLDTIYTVSEGTTIESKLINCHYPVTNNSFVLQFGTIVKKIEGMSEEQAAEMAT
KSHA2	GPSYMIDKLWSAGRDPESTPNIYLINCHYPISPTSFRLQYGVMVERPEGVPPEQAEQIAQ
	***:*:::: * : *: * :* :* :* : * : * : *
	β折叠 α5 螺旋
KSHA1	OF GNETAKGE EQDITE TWENKER TO NPLICEED GPVY QURRWYEQEYVDVED VAPENTORE
KSHA5	OF AEGVOLOFFODVE TWENKAPTONPLI SEEDGPVYOL RRWYOOFYVDVEDITEDWTKRF
KSHA3	KI TEGVGEGELODVE IWKNETELENPLI CEEDGPVYOL REWYFOFYVDVADVTEKNTGRE
KSHAd	METOGLEROFACITETWEEKSRIENPLITERDCPVVOLERWYNOFVVDLEDVTPDMTORE
KSHA2	AVAOGVAIGERODVETUKNIKSRIDNPLIGERDDVVOLRRWVFOEVVDVEDIRPEMVNRE
nonna	· * ** **** · * * ***** **************
	α5螺旋
KSHA1	EFEMDTTRPVAAWMKEVEANIARKAALDTETRSAPEQSTTAG-
KSHA5	EFEIDTTRAVASWOKEVAENLAKOAEGSTATP
KSHA3	EFEVDTAKANEAWEKEVAENLERKKREEEQGKQEAEV
KSHA4	EFEVDTSRALESWHKEVEENLAG-TAE
KSHA2	EYEIDTTRALTSWQAEVDENVAAGRSAFAPNLTRAREAASAESGS
	::**:: :* ** *:

(a) 5个 KSHA 的比对



(b) 无底物时 loop 的形态
(c) 有底物时 loop 的形态
α5 螺旋、部分 β 折叠、loop 和底物分别用红色、蓝色、黄色和绿色标出

图 1 KSHA5的氨基酸比对及结构 Fig. 1 Alignment of amino acid of KSHA5 and its structure

从图 1(a)上可以看到,这 5 种 KSHA 呈现高度 相似,但 loop 区的氨基酸差别很大, α5 螺旋、部分 β 折叠,以及二者之间的部分氨基酸也呈现很大差别, 对照图 1 (b) 和 1 (c) 可以看到, α5 螺旋和这部分 β 折 叠的位置与 loop 距离较近,这些位置的氨基酸都位 于底物进出活性中心的通道处.每种 KSHA 的 loop 的氨基酸不同,对应的α5 螺旋和这部分 β 折叠的氨 基酸就不同,推测它们之间可能存在协同变化的关 系;而且,loop 靠近底物入口处的氨基酸 T224-D228 (图 1 (b) 和 1 (c) 中被椭圆形标中的 loop 区域), 在有无底物 AD 时变动非常明显,那么它可能参与到 底物的运送过程进而调控酶活,因此,本研究将对 loop 的这部分区域进行定点突变,分别突变成性质不 同的氨基酸 T224V、N225L、Y226F、D227S 与 D228S,探究这些氨基酸的作用.

另外,通过不同类型的 KSHA 的比对,还发现在 loop 上存在两个非常保守的氨基酸,R217 与 D219, 用软件 Discovery Studio 2.5 分析了两者的相互作用, 发现它们之间存在着盐桥相互作用,这可能起到固定 loop 位置的作用,使 loop 能更贴合到底物入口处.因 此,将两者之一进行突变,把 R217 变成 A217,使盐 桥作用丧失,让 loop 比较松弛地靠近入口,使入口变 大,考察其对活性的影响.

2.2 定点突变结果

用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Hind* Ⅲ酶切质粒,鉴 定重组质粒的正确性,如图 2 所示.



M. DL5000 (100 ~ 5 000 bp) ; 1. pET28-*kshA5*/*Nco* I and *Hind* III ; 2. pET28-*kshB*/*Nco* I and *Hind* III

图 2 重组质粒 pET28-kshA5 与 pET28-kshB 酶切 电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of pET28-*kshA5* and pET28-*kshB* treated with restriction endonuclease

两个泳道在 1 000 bp 以上位置出现的条带,分别 与 ksh45 和 kshB 基因片段大小一致,证明重组质粒

pET28-kshA5与 pET28-kshB 构建成功.

突变位点和突变策略确定后,选用全质粒 PCR 的方法进行基因突变,均扩增出大约 7 000 bp 的条带 (图 3). 经测序证明都突变成了相应的目的碱基.



1. R217A; 2. T224V; 3. N225L; 4. Y226F; 5. D227S; 6. D228S; M1. DL2000 (100 ~ 2 000 bp); M2. DL15000 (250 ~ 15 000 bp)

图 3 loop 的定点突变 Fig. 3 Site-directed mutagenesis of the loop

2.3 酶活分析

由于 KSHAB 酶是由加氧酶成分 KSHA 与还原 酶成分 KSHB 同时存在才能发挥羟化酶 KSHAB 的 活性,而且已有报道证明加氧酶组分 KSHA 以 O₂为 最终电子受体,在空气中纯化 KSHA 组分,会使 KSHA 组分失去活性,还原酶组分 KSHB,除了作为 KSHAB 酶催化体系的关键组分,同时还可以为 KSHA 的纯化提供还原性的环境,避免在有氧情况下 KSHA 酶活性的丢失^[7-8].因此,本实验采用 A 组分 与 B 组分共纯化的方式进行蛋白纯化,蛋白纯化的 结果如图 4 所示.



野生型; 2. KSHA_{R217A}B; 3. KSHA_{T224v}B; 4. KSHA_{N225L}B;
5. KSHA_{Y226F}B; 6. KSHA_{D227S}B; 7. KSHA_{D228s}B; M. protein ruler I

图 4 蛋白纯化后的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig. 4 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified proteins

由图 4 可知,所有蛋白均在相对分子质量 4× 10⁴ 以上位置处显示两条带,其大小与 KSHA、KSHB 组分的大小一致,证明所有蛋白均纯化成功.用软件 Quantity One 分析所得各纯化蛋白的 A 组分与 B 组 分含量的比例,使用 Trace Tracking 方法以及高斯建 模模拟各条带的灰度值来确定 A 组分与 B 组分含量 的比例.通过添加纯 KSHB 蛋白,使各纯化蛋白的 A 组分与 B 组分含量的比例一致,测定酶活力的结果 见表 1.

表 1 突变体的活性分析 Tab. 1 Assessment of the activity of different mutants

酶	比活力/(nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)	相对活性/%
KSHAB	24.0 ± 1.3	100
KSHA _{R217A} B	8.3 ± 3.6	35
KSHA _{T224V} B	ND	ND
KSHA _{N225L} B	5.6 ± 2.5	23
KSHA _{Y226F} B	18.4 ± 2.7	77
KSHA _{D2278} B	8.4 ± 4.0	35
KSHA _{D228S} B	ND	ND

注: ND 表示没有可检测的活性.

loop 经突变后的酶的活性较突变前的都有所降低,还有一些突变甚至给酶造成了完全失活的结果.将第 217 位的 R 变成 A 后,活性降低为原来的 35%,碱性氨基酸变化成非极性氨基酸,丧失原来与 第 219 位 D 之间的盐桥作用,使 loop 更加松弛地靠 在活性中心处,导致 loop 上靠近底物入口处的氨基 酸与α5 螺旋、β 折叠等附近区域的相互作用减弱,推 送底物进入活性中心的能力下降,可见,KSHA 蛋白 中该位置上的 R 高度保守是非常重要的.

T224 侧链带有一个羟基,具有形成氢键的能力, 从图 5(a)与 5(b)上看,在结构位置上,它更靠近*a*5 螺旋.在底物进入活性通道时,T224 有可能与*a*5 螺 旋上某个氨基酸作用,能较好地打开底物通道,顺利 让底物通过,而其突变成 V 后,极性发生较大改变. V 是非极性氨基酸,容易埋在疏水性活性中心,不利 于 loop 打开通道,这可能是突变后监测不到酶活的 原因.同样,第 225 位 N 变为 L 后,活性也大大下 降,Y226F 也有明显下降. 突变前两者的氨基酸具有 形成氢键的能力,在蛋白质结构中是位于内外部皆可 的氨基酸,而突变后的非极性氨基酸更倾向于伸入疏 水性活性中心,不利于打开 loop 这个"盖子",这也 是 loop 区该处位置在有无底物存在时发生很大变动 的原因.没有底物时,它们可以靠近活性中心,起到 保护活性中心的作用;当有底物存在时,这些氨基酸 又向外运动,打开活性中心,在与周围区域的相互作 用力下,给底物营造合适的环境,推送底物进入活性 中心. D227(图 5(c)与 5(d))和 D228 从结构上看,有 无底物存在时,虽然它们的位置变动较大,但它们的 侧链更多地暴露在外面. D227 和 D228 是酸性氨基 酸,可电离产生盐桥,与溶液中离子相互作用,可能 起到支撑固定 loop 结构的作用,让 T224-Y226 能与 其周围的氨基酸产生相互作用,调节底物通道;而突 变成丝氨酸后,灵活性增强,丝氨酸可转动到活性中 心处,也可暴露在外,削弱了对 loop 的固定作用.



(a) 无底物时的 T224 (b) 有底物时的 T224



图 5 loop 上靠近底物进入酶活性中心入口处的氨基酸 Fig. 5 Amino acids of the loop near the entrance of the substrate entering the enzyme active center

3 讨 论

本文运用定点突变技术,确定了 KSHA5 的 loop 对酶活的重要性; loop 上的氨基酸对稳定 loop 运动 结构和调节底物通道都有着不同的作用,尤其是靠近 底物入口处的氨基酸,如 T224、N225 和 Y226,它们 与周围 α 5 螺旋和 β 折叠存在一定相互作用,共同调节 底物通道与底物运送能力; D227和D228 起到支撑固 定 loop 结构的作用.磷酸丙糖异构酶的 loop 上的 A176 就与其附近的 β 折叠上的 Y208 能产生相互作 用,调节 loop 的开关运动^[4].分枝杆菌(*M. neoaurum*) TCCC11028 的 3-甾酮- Δ ¹-脱氢酶靠近底物活性中心 处的 loop 上的 Ser138 能形成氢键,在底物 AD 进入 活性中心后,能用氢键固定住 loop,保持活性中心的 疏水性;而突变成 Leu 后,氢键作用丧失,从而导致 活性中心暴露,最终影响了酶对底物的活性^[3].

loop 在蛋白质结构中的运动较为灵活,底物进出 活性中心时 loop 旋转摆动的动态过程,以及在这个 运动过程中 loop 上各氨基酸对底物的某种相互作 用,还有底物进入活性中心过程中 loop 与 o5 螺旋和 部分β折叠的相互作用,在目前的晶体结构信息中是 无法获知的, 仅用无底物或者底物在活性中心时这两 个时刻解析的晶体结构,不能准确判断氨基酸的具体 作用. 而本研究运用定点突变技术揭示了 loop 上氨 基酸的具体作用,这将使后面的研究工作更加具有针 对性. 那么, 在下一步工作中, 我们会把工作重点放 到 loop 的 T224、N225 和 Y226 这 3 个氨基酸上,并 结合其附近的 α5 螺旋与 β 折叠,进行组合突变,研究 三者对底物通道的调控,进而能提高酶的羟化活 性. 本研究成果有助于理解 9α-羟化酶及其催化机 理,也为采用蛋白质工程改造 9α-羟化酶活性提供理 论依据.

参考文献:

- [1] Angelova B, Mutafov S, Avramova T, et al. Effect of nitrogen source in cultivation medium on the 9α-hydroxylation of pregnane steroids by resting *Rhodococ-cus* sp. cells[J]. Biotechnology & Biotechnology Equipment, 2005, 19 (3) : 113–116.
- [2] Penfield J S, Worrall L J, Strynadka N C, et al. Substrate

specificities and conformational flexibility of 3-ketosteroid 9α -hydroxylases [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2014, 289 (37) ; 25523–25536.

- [3] Xie R, Shen Y, Qin N, et al. Genetic differences in ksdD influence on the ADD/AD ratio of *Mycobacterium neoaurum*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2015, 42 (4) : 507–513.
- [4] Derreumaux P, Schlick T. The loop opening/closing motion of the enzyme triosephosphate isomerase[J]. Biophysical Journal, 1998, 74 (1): 72–81.
- [5] Jennens M L, Lowe M E. A surface loop covering the active site of human pancreatic lipase influences interfacial activation and lipid binding[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1994, 269 (41) : 25470–25474.
- [6] Dugi K A, Dichek H L, Santamarina-Fojo S. Human hepatic and lipoprotein lipase: The loop covering the catalytic site mediates lipase substrate specificity[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1995, 270 (43) : 25396– 25401.
- [7] 姚抗.分枝杆菌甾醇代谢机制的解析以及其代谢工程 改造应用于制备重要甾药中间体的研究[D].上海:华 东理工大学,2014.
- [8] Petrusma M, Dijkhuizen L, van der Geize R. *Rhodococcus rhodochrous* DSM43269 3-ketosteroid 9α-hydro-xylase, a two-component iron-sulfur-containing mono-oxygenase with subtle steroid substrate specificity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(16): 5300–5307.

责任编辑:郎婧