



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20160174

紫红红球菌 9α -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 $\alpha 5$ 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,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- 9α -hydroxylase is the key enzyme that transforms androst-4-ene-3,17-dione into 9α -hydroxyandrost-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 $\alpha 5$ -helix and β -sheet amino acids, while D227 and D228 played certain 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 9α -hydroxylase modification through protein engineering.

Key words: 3-ketosteroid- 9α -hydroxylase; androst-4-ene-3,17-dione; 9α -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione; loop; site-directed 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 9α 羟基化产物 9α -羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮 (9α -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione, 9α -OH-AD) 是生产 9α 位上有卤素的多种皮质激素的重要前体^[1]. 能够进行 9α -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- 9α -羟化酶 (3-ketosteroid- 9α -hydroxylase, KSHAB) 负责将 AD 转化生成 9α -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 9 α -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*) DH5 α 、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'-CCATGGTGTCCATCGACACCGCACGG-3', *kshA5*-T-R1: 5'-AAGCTTGGGGGTCGCGGTGGAGCC-3'; *kshB* 的上、下游引物分别为 *kshB*-T-F1: 5'-CCATGGTGTGACAGCCGTCCAGGCACC-3', *kshB*-T-R1: 5'-AAGCTTGAACTCGATGCGCACGTGGT-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 μ L): 基因组模板 1 μ L, 2 \times GC Buffer I 25 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 8 μ L, LA *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L, 10 μ mol/L 上、下游特异性引物各 2 μ L, ddH₂O 补齐至 50 μ L. 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 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

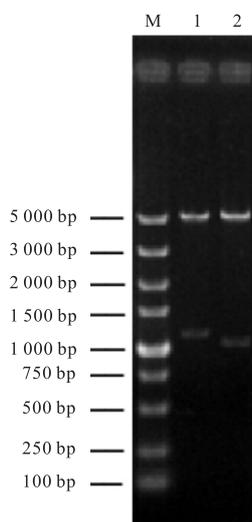
以重组表达载体 pET28-*kshA5* 为模板, 采用全质粒 PCR 的方法进行突变子的构建, R217 的上、下游突变引物分别为 TB_{R217A}-F: 5'-ACCGGTGCGGAGGACGTCATCTCCG-3', TB_{R217A}-R: 5'-GTCCTCCGCA CCGTTCGAGTGCAT-3'; T224 的上、下游突变引物分别为 TB_{T224V}-F: 5'-TCCGGCGTGA ACTACGACGACCCCAAC-3', TB_{T224V}-R: 5'-GTAGTTCACGCCGGAGATGACGTCC-3'; N225 的上、下游突变引物分别为 TB_{N225L}-F: 5'-GGCACCCCTGTACGACGACCCCAACG-3', TB_{N225L}-R: 5'-GTCGTACAGGGTGCCGGA GATGACG-3'; Y226 的上、下游突变引物分别为 TB_{Y226F}-F: 5'-ACCAACTTTGACGACCCCAACGCCG-3', TB_{Y226F}-R: 5'-GTCGTCAAAGTTGGTGCCGGA GATGACG-3'; D227 的上、下游突变引物分别为 TB_{D227S}-F: 5'-AACTACAGCGACCCCAACGCCGAA C-3', TB_{D227S}-R: 5'-GGGGTTCGCTGTAGTTGGTGCC GGAGATG-3'; D228 的上、下游突变引物分别为 TB_{D228S}-F: 5'-TACGACAGCCCAACGCCGA ACTG C-3', TB_{D228S}-R: 5'-GTTGGGGCTGTCGTAGTTGGT GCCGGAG-3' (其中斜体部分的碱基为突变位点). PCR 反应体系 (50 μ L): pET28-KSHA5 模板 1 μ L, 10 \times buffer for KOD plus 5 μ L, dNTP mixture 6 μ L,

对照图 1(b) 和 1(c) 可以看到, $\alpha 5$ 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 $\alpha 5$ 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

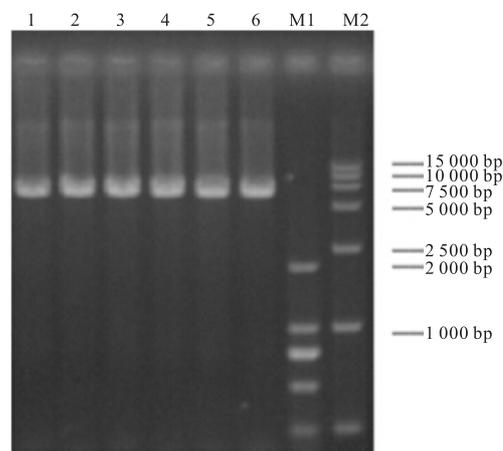
图 2 重组质粒 pET28-*kshA5* 与 pET28-*kshB* 酶切电泳图

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 *kshA5* 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.



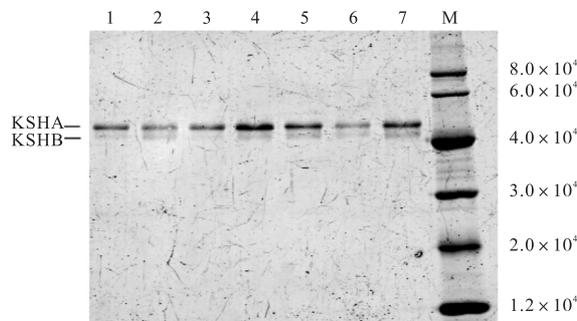
1. R217A; 2. T224V; 3. N225L; 4. Y226F; 5. D227S; 6. D228S; M1. DL2000 (100 ~ 2 000 bp); M2. DL15000 (250 ~ 15 000 bp)

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 O_2 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.



1. 野生型; 2. KSHA_{R217A}; 3. KSHA_{T224V}; 4. KSHA_{N225L}; 5. KSHA_{Y226F}; 6. KSHA_{D227S}; 7. KSHA_{D228S}; 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 4×10^4 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

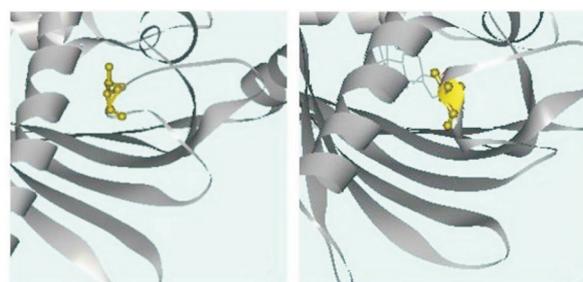
酶	比活力/(nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)	相对活性/%
KSHAB	24.0 ± 1.3	100
KSHA _{R217A} B	8.3 ± 3.6	35
KSHA _{T224V} B	ND	ND
KSHA _{N225L} B	5.6 ± 2.5	23
KSHA _{Y226F} B	18.4 ± 2.7	77
KSHA _{D227S} B	8.4 ± 4.0	35
KSHA _{D228S} B	ND	ND

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 $\alpha 5$ 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.

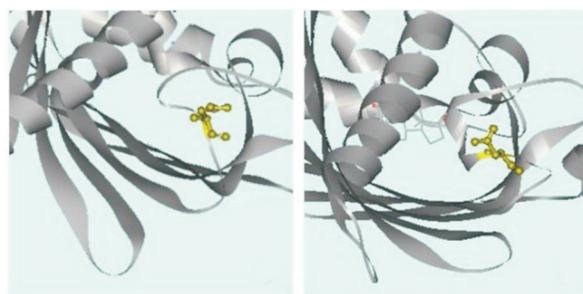
T224 侧链带有一个羟基,具有形成氢键的能力,从图 5(a)与 5(b)上看,在结构位置上,它更靠近 $\alpha 5$ 螺旋.在底物进入活性通道时,T224 有可能与 $\alpha 5$ 螺旋上某个氨基酸作用,能较好地打开底物通道,顺利让底物通过,而其突变成 V 后,极性发生较大改变.V 是非极性氨基酸,容易埋在疏水性活性中心,不利于 loop 打开通道,这可能是突变后监测不到酶活的原因.同样,第 225 位 N 变为 L 后,活性也大大下降,Y226F 也有明显下降.突变前两者的氨基酸具有形成氢键的能力,在蛋白质结构中是位于内外部皆可的氨基酸,而突变后的非极性氨基酸更倾向于伸入疏水性活性中心,不利于打开 loop 这个“盖子”,这也是 loop 区该处位置在有底物存在时发生很大变动的原由.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



(c) 无底物时的 D227

(d) 有底物时的 D227

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 $\alpha 5$ 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 $\alpha 5$ 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 $\alpha 5$ 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 *Rhodococcus* 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 -hydroxylase, a two-component iron-sulfur-containing monooxygenase with subtle steroid substrate specificity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(16): 5300–5307.

责任编辑: 郎婧