

文章编号 1000-5013(2004)04-0426-04

1, 3-丙二醇脱氢酶三级结构的模建

张光亚 陈迪 方柏山

(华侨大学材料科学与工程学院, 福建泉州 362021)

摘要 利用生物大分子数据库及生物信息学技术, 对来源于 *Klebsiella pneumoniae* 的 1, 3-丙二醇脱氢酶分子进行二级结构预测、多序列联配. 实验发现, 其具有较保守的铁离子结合位点, 而未发现常见的 NAD(H) 结合位点. 在此基础上, 利用同源建模法和穿线法模建该酶的三级结构, 进一步发现铁离子结合位点在空间上形成一口袋状结构. 探讨对其作用机制, 同时发现该序列中存在 2 个含铁元素的乙醇脱氢酶信号.

关键词 1, 3-丙二醇脱氢酶, 三级结构, 同源建模法, 穿线法

中图分类号 Q 554⁺.901: Q 617

文献标识码 A

1, 3-丙二醇是一种重要的化工原料. 作为单体, 它可以参与多种化学合成反应, 生产聚酯、聚醚、聚氨酯等缩聚物^[1]. 微生物发酵生产 1, 3-丙二醇是当前研究的热点^[2]. 1, 3-丙二醇脱氢酶(EC 1. 1. 1. 202) 又称 1, 3-丙二醇氧化酶, 是产生 1, 3-丙二醇过程中的关键酶. 它能将甘油氧化为二羟基丙酮过程中产生的质子传递到 3-羟基丙醛, 并释放出 1, 3-丙二醇. 编码 1, 3-丙二醇脱氢酶的基因已被克隆, 并由此推导出该酶的氨基酸序列^[3]. 到目前为止, 未见有 1, 3-丙二醇脱氢酶晶体结构的报道, 也不能在 PDB 网中搜索到该酶的结构信息. 了解该酶的结构特征, 对研究酶的固定化和酶的构效关系及酶的定向进化改造等, 均具有重要的指导意义. 本文研究 1, 3-丙二醇脱氢酶的二级结构. 在此基础上, 利用同源建模法模建该酶的三级结构, 并确定其铁离子结合位点的三级结构, 为利用该酶生产 1, 3-丙二醇奠定理论基础.

1 材料与方 法

1.1 材料

三级结构可视化软件 Cn3D 和 Swiss-Pdb Viewer (SPDBV). 供试蛋白质序列来自 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). 本文中选用具有工业应用潜力的 *Klebsiella pneumoniae* (肺炎克雷伯氏菌) 中的 1, 3-丙二醇脱氢酶(注册号为 Q59477).

1.2 分析方法

蛋白质二级结构的预测依据 PHD 程序^[4] (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>). 利用同源建模法进行三级结构模建的 SWISS-MODEL 服务器 (<http://www.expasy.org/swiss-mod/SWISS-MODEL.html>), 进行蛋白质结构位点、功能域搜索的 ScanProsite 服务器 (<http://us.expasy.org/tools/scanprosite>). 利用“Threading”即“穿线法”进行三级结构预测的 UCLA-DOE Fold Server 服务器地址 (<http://fold.doe-mbi.ucla.edu/>), Loopp 服务器也是一个运用“穿线法”预测蛋白质序列三级结构的服务器 (<http://ser-loopp.tc.cornell.edu/loopp.html>).

2 结果与讨论

2.1 1, 3-丙二醇脱氢酶的二级结构预测

蛋白质的氨基酸序列决定其功能, 也决定其高级结构. 二级结构是氨基酸序列和三维构象之间的桥

收稿日期 2004-03-11

作者简介 张光亚(1975-), 男, 助教, 硕士, 主要从事生物信息学的研究. E-mail: fanghs@hqu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(20276026); 福建省自然科学基金重点基金资助项目(D0120002)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

梁, 对二级结构的预测有时能得到许多结构信息. Chour Fasman 预测法的核心是对单一序列进行分析, 其预测的结果也只能达到约 60% 的预测准确率. 但现已公认, 根据理想的蛋白质序列联配结果进行蛋白质二级结构预测的成功率大为提高. 而且, 在结合了多种神经网络的结果, 它至少比根据单一序列预测的准确性高出 10%. 文献 [5] 报道, PHD 程序是目前此方面的最好程序. 故采用 PHD 程序对来自 *Klebsiella pneumoniae* 的 1, 3 丙二醇脱氢酶二级结构进行预测. 结果表明, 在该蛋白中存在着大量的 α 螺旋. 在含 387 个氨基酸残基的 1, 3 丙二醇脱氢酶中, 至少存在 12 个较长的 α 螺旋区域, 而且这些区域均分布在该蛋白的 C 端和 N 端. 而且, 其中间区域 (约从 120~ 180 位) 则为 β 折叠和 Loop 环. β 折叠相对较少, 只有 6 个, 而且集中在 N 端, 如图 1 所示.

		1	2	3	4	5	6
AA	MSYRMFDYLVPNVFFGPNAI	SWGERCQLLGGK	KALLVTDKGLRA	IKDGA	VTKTLHYLR		
PHD	EEEEEE	EEEE	HHHHHHHHHH	EEEEEE	HHH	HHHHHHHH	
Rel	9965323346651342551	3699999999908971	79994677233431	24899999997			
SUB	LLLL	... LLL	... LL	... HHHHHHHHHH	... LLL	... EEEE	... LLL
		7	8	9	10	11	1
AA	EAGIEVAIFDGVENPKD	TNMRDGLAVFRREQCDI	IVTVGGGSPHDCGK	IGIAA	THEGD		
PHD	H	EEEEEE	HHHHHHHHHHHH	EEEE	HHHHHHHHHHHH		
Rel	37976999727889984	3689999999996399	269991994789999999997	736795			
SUB	... LLEEEEE	... LLLLLL	... HHHHHHHHHHHH	... LL	... EEEE	... LL	... HHHHHHHHHHHH
		13	14	15	16	17	1
AA	LYQYAGIETLTNPLPP	IVAVNTTAGTASEVTRHCVL	TNTETKVKFVI	VSMRNLPSVS	IND		
PHD	EEEE	EEEE		EE	EEEE		
Rel	3221576413547971	58971675657546561	56644555531	21114568982	67751		
SUB	... LLL	... L	... LLL	... EEEE	... LLL	... LLLL	... EEEE
		19	20	21	22	23	2
AA	PLLMIGKPAAL	TAA TGMDALTHAVEAYI	SKDANPVTDA	AAMQA	IRL	ARNLRQAV	ALGSN
PHD	HHH	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHHHHHH				
Rel	41022265465552468	999999997645315821	489999999999999999999	606654			
SUB	... LL	... HHH	... HHHHHHHHHHHH	... H	... LL	... HHHHHHHHHHHH	... LLL
		25	26	27	28	29	3
AA	LQARENMAYASLL	AGMAFNANLGYVHAMA	HQLGGLYDM	PHGVANAVLL	PHVARYNL	I	AN
PHD	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHH				
Rel	4689999887765556665	211133545454342111	143311446534787	77512122			
SUB	... HHHHHHHHHHHHHHHHH	... H	... H	... H	... HH	... HHHHHH	...
		31	32	33	34	35	3
AA	PEKPADIAELMGEN	ITGLSTLDAEKA	IAA ITRLSMD	IGIPQHLRDL	GVKEADFPYMAEM		
PHD	HHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHHHHHH	HHHH	HHHHHHHHHH			
Rel	7999999999831468	999931778999999999999999999	6588416654587535	37999999			
SUB	HHHHHHHHHH	... LLLLLL	... HHHHHHHHHHHHHHLL	... HHH	... LLLL	... H	... HHHHHH
		37	38	39	40	41	4
AA	ALKDGN	AFSNPKGNEQE	IAAIFRQAF				
PHD	HHH	HHHHHHHHHH					
Rel	9723456689987768	9999999999549					
SUB	HH	... LLLLLLLLLL	HHHHHHHHHH	L			

图 1 1, 3 丙二醇脱氢酶二级结构 (PHD 算法)

图 1 中, 黑线标出的一段序列为推测的铁结合序列模体 (Motif), 其共有序列 (Consensus Sequence) 为 (G-XX-H-X-X-A-H-X-X-G-X-X-X-X-P-H-G). 由于在 1, 3 丙二醇脱氢酶催化过程中需要 NAD(H) 的参与, 但传统的 NAD(H) 结合位点的高度保守序列 G-X-G-X-X-G 或 G-X-G-X-X-A 均未能在序列中找到, 可能在这些脱氢酶中存在着其它的 NAD(H) 的结合位点, 这与文献 [6] 等报道的结果一致. 他们认为, 这些 1, 3 丙二醇脱氢酶属于 III 型乙醇脱氢酶. 在 PDB 中收录了不少乙醇脱氢酶的三维结构, 这对预测和研究 1, 3 丙二醇脱氢酶脱氢酶的三级结构, 及其功能位点具有重要的指导作用.

相应地, 这一段保守序列所形成的二级结构, 如图 1 所示. 尽管 PHD 程序预测其二级结构为 α 螺旋区域, 但这一段预测可信度指数 (Reliability Index of Prediction) 是所有预测可信度指数中最低的. 所以, 在其子集 (Subset) 中这一区域未显示出二级结构特征. 子集的期望准确率 (Expected Accuracy) 大于 82%, 可以推测这一区域可能在三级结构上形成一个铁结合的某种结构.

2.2 1, 3 丙二醇脱氢酶的三级结构的模建

将来源于 *Klebsiella pneumoniae* 的 1, 3 丙二醇脱氢酶的序列 Q59477 提交到 SWISS-MODEL 服务器, 并以 E-mail 形式返回结果. 返回的结果是以 .PBD 为后缀名的文件, 经手工修改后, 再提交到 SWISS-MODEL 服务器, 用 Gromos 96 算法进行修正, 使分子模型的能量最小. 最后, 将修正值通过 Swiss-Pdb Viewer 进行观察, 所得到的 1, 3 丙二醇脱氢酶的三级结构, 如图 2 所示.

有文献报导^[7,8], 1,3-丙二醇脱氢酶在生物体内可能由相同分子量的亚基以八聚体或十聚体的形式存在, 即该酶具有四级结构. 文中给出的是其中一个亚基的三级结构, 该酶可能为一球形结构. 而 Fe^{2+} 可能的结合位点的三级结构显示(图3), 它形成一个常见的“口袋”状的结构. Fe^{2+} 可能位于这个“口袋”的内部, 与其中的 3~4 个氨基酸残基螯合, 而且很可能是 His 和 Pro. 由于在单个亚基中未见有 NAD 的结合位点, 而同处于该催化反应中的甘油脱氢酶中 NAD 的结合位点处于由几个折叠和螺旋形成的 Rossmann 折叠中, 并非和在位置上非常接近的氨基酸残基形成氢键^[9]. 可以推测, 可能 1,3-丙二醇脱氢酶中的 NAD 也存在同样或相似的结合方式. 这需要通过真正获得该酶的三级结构才能得到证实.

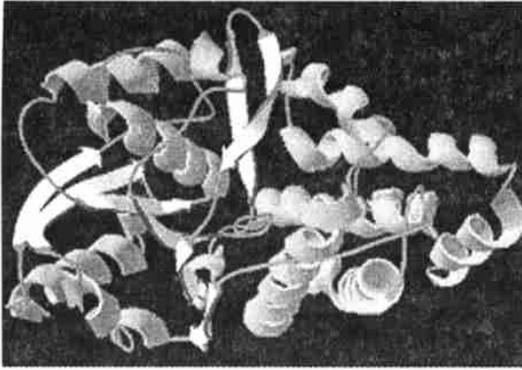


图2 1,3-丙二醇脱氢酶三级结构

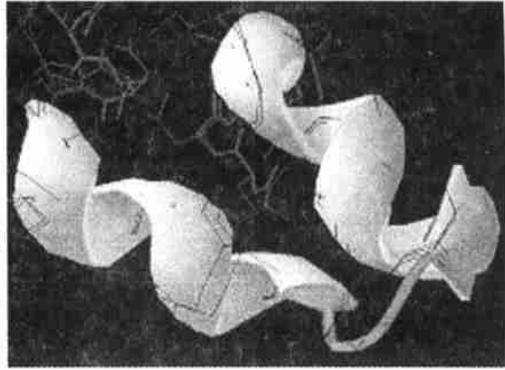


图3 1,3-丙二醇脱氢酶铁结构序列模体三级结构

除用同源建模法建模该酶的三级结构外, 还采用另一种预测蛋白质三级结构的 Threading 法进行分析. 但从预测的结果看, 利用“同源建模”的方法预测得到的结果都较好, 而且与二级结构预测的结果比较时, 也表现出较高的相似性. Threading 法所预测的结果重复性较差. 这是由于大多数 Threading 法都被认为是试验性的, 对于使用 Threading 服务器建立的结构模型, 都可能出现较多的错误. 因为, Threading 的设计目的是假设序列作为可能的候选者去匹配特殊的折叠, 而不是建立有用的模型.

2.3 1,3-丙二醇脱氢酶的功能域分析

将 Q59477 的氨基酸序列提交到 ScanProsite 服务器, 对蛋白质中的相似结构位点、功能域进行搜索. 该服务器通过将提交的序列进行比较, 可得到一系列具有相似结构位点或功能域的已知的蛋白质序列. 从而对研究 1,3-丙二醇脱氢酶的某些功能位点提供相关的信息, 为进一步研究蛋白质的构效关系奠定基础, 结果如表 1 所示.

表1 ScanProsite 搜索得到的结构和功能位点

序号	结构和功能位点	功能描述	序号	结构和功能位点	功能描述
PDOC00001	141-144 NITTA	N-糖基化位点		40-42 TdK	
PS00001	2-4 SyR		PDOC00005	169-171 SwR	蛋白质激酶
			PS00005	103-106 SphD	C-磷酸化位点
PDOC00006	177-180 SinD	酪蛋白激酶 II 磷酸化位点		146-149 TasE	
PS00006	195-198 TgmD			242-249 Kar. ErmaY	
	319-322 StmD		PDOC00007	350-356 Kea. Dfp. Y	酪氨酸激酶
			PS00007	32-37 GGkkAL	磷酸化位点
PDOC00008	255-260 GMafNN	N-十四烷基 化位点		110-115 GIgiAA	
PS00008	282-287 GVanAV			112-117 GIaaTH	
	348-353 GVkeAD		PDOC00009	32-35 gGKK	酰胺化位点
	365-370 GNafSN	PS00009			
PDOC00059	177-205 SInDplImlgk	含铁元素的乙 醇脱氢酶信号 1	PDOC00059	262-282 GYVHAMA	含铁元素的乙 醇脱氢酶信号 2
PS00913	PapltAaTgmDALIhavE		PS00060	HQLGGLYDMAHGVA	

由表 1 可知, 该氨基酸序列中包含较多的功能位点. 但是, 除含铁元素的乙醇脱氢酶信号 1 和含铁元素的乙醇脱氢酶信号 2 这两个位点外, 其它的一些结构和功能位点由于序列较短, 更可能是随机匹配的结果. 在上述信号 1 位点后大约 60 个氨基酸处, 存在着与 Fe^{2+} 结合的序列模体, 即信号 2. 这表明对这 2 个位点的判断是有依据的. 而且这一段结构、功能位点所对应的序列较长, 不大可能是随机匹配而造成的, 从而进一步证实该酶属于乙醇脱氢酶家族.

3 结束语

1, 3 丙二醇脱氢酶在微生物发酵生产 1, 3 丙二醇中具有重要作用. 本文利用生物信息学方法分析了该酶的二级结构, 并在此基础上利用同源建模的方法建模了该酶的三级结构. 发现其较保守的铁离子结合位点(G-XX-H X X-A-H X-X-G X X X-X-X-P-H-G), 并探讨了该结合位点可能的作用机制. 它属于属于 III 型乙醇脱氢酶家族. 这对揭示酶个构效关系具有重要意义. 对用实验的方法对酶进行定向改造具有一定的指导意义. 但是, 由于未能找到传统的 NAD(H) 结合位点的高度保守序列, 因此推测可能存在其它 NAD(H) 结合位点或者不同的结合方式. 相关的研究仍需要进一步深入.

参 考 文 献

- 1 修志龙. 微生物发酵法生产 1, 3 丙二醇的研究进展[J]. 微生物学通报, 2000, 27(4): 300~ 302
- 2 Barbirato F, Himmi E H, Conte T, et al. 1, 3 propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries[J]. Industrial Crops and Products, 1998, (7): 281~ 289
- 3 Frank A S, Betsy L L, Douglas C C. Construction and characterization of a 1, 3 propanediol operon[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1998, 64(1): 98~ 105
- 4 Rost B. PHD: Predicting one dimensional protein structure by profile based neural networks[J]. Methods in Enzymology, 1996, (266): 525~ 539
- 5 张成岗, 贺福初. 生物信息学方法与实践[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 140~ 141
- 6 Daniel R, Boenigk R, Gottschalk G. Purification of 1, 3 propanediol dehydrogenase from *Citrobacter freundii* and cloning, sequencing, and overexpression of the corresponding gene in *Escherichia coli* [J]. J. Bacteriol., 1995, 177 (8), 2 151~ 2 156
- 7 Hassiba M, Regis M. Purification and characterization of the 1, 3 propanediol dehydrogenase of *Clostridium butyricum* E5 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27: 399~ 405
- 8 Talarico T L, Axelsson L T, Novotny L, et al. Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: Purification of 1, 3 propanediol: NAD oxidoreductase [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1990, 56: 943~ 948
- 9 Sergey N R, Jacky B, Sveta S, et al. Glycerol dehydrogenase: Structure, specificity, and mechanism of a family III polyol dehydrogenase [J]. Structure, 2001, (9): 789~ 802

Modeling the Tertiary Structure of 1, 3-Propanediol Dehydrogenase

Zhang Guangya Chen Di Fang Baishan

(College of Mater. Sci. & Eng., Huaqiao Univ., 362021, Quanzhou, China)

Abstract Based on the knowledge of bioinformatics, secondary structure prediction and motif sequencing alignment of 1, 3 propanediol dehydrogenase from *Klebsiella pneumoniae* were performed with the biological macromolecule databases and softwares. The results showed that it contains a fairly conserved iron binding motif instead of the commonly seen NAD(H)-binding motif. On this basis, homologous modeling and threading were used to model the tertiary structure. The results of homology modeling indicated that the conserved iron binding motif formed a cleft where the Fe^{2+} may be bounded. Two iron containing alcohol dehydrogenases signatures were found in it.

Keywords 1, 3 propanediol dehydrogenase, tertiary structure, homologous modeling, threading