

文章编号: 1000-5013(2010)05-0542-06

辅酶依赖型和不依赖型甘油脱水酶的比较

杨仲丽, 方柏山, 余劲聪, 王庆花, 李梓君

(华侨大学 工业生物技术福建省高等学校重点实验室, 福建 泉州 362021)

摘要: 实验比较源自肺炎克氏杆菌(*K. pneumoniae*)和丁酸梭状芽孢杆菌(*C. butyricum*)中的甘油脱水酶(GDHt)的辅酶依赖特性. 采用生物信息学的方法,对两种酶的异同点进行分析,发现两种酶结构上相似性较低、亲缘性较远、分属于两个不同的家族. SMART 数据库搜索结果表明,*C. butyricum*中不依赖辅酶的甘油脱水酶及其再激活酶,分别属于 gly-Radical 和 RadicalSAM 家族,多序列比对得到的一段富含半胱氨酸残基 C* * C* * C 的保守序列正是其共同特征.

关键词: 肺炎克氏杆菌; 丁酸梭状芽孢杆菌; 辅酶; 甘油脱水酶; 维生素 B₁₂; 依赖性
中图分类号: Q 55 **文献标识码:** A

甘油脱水酶(GDHt)是微生物发酵法生产 3-羟基丙醛(3-HPA),进而生产 1,3-丙二醇(1,3-PD)过程中的重要限速酶之一. 在已发现能发酵甘油,产生 1,3-丙二醇(1,3-PD)的微生物中[1],克氏肺炎杆菌(*K. pneumoniae*)和丁酸梭状芽孢杆菌(*C. butyricum*)具有较高的 1,3-PD 转化率及生产强度,是研究得比较多的两种菌^[2]. *K. pneumoniae* 以甘油为底物发酵生产(3-HPA)的一个关键的限制点,是编码一种依赖辅酶 B₁₂的甘油脱水酶,即需要在培养基中额外地加入维生素 B₁₂. *C. butyricum* 具有良好的 1,3-PD 耐受力,且其发酵过程具备对辅酶 B₁₂的不依赖性. 该菌属于严格厌氧菌,在实验室培养条件苛刻,而在工业培养中方便. 对于 *C. butyricum* 中甘油脱水酶不依赖辅酶的报道^[3-5],使得该种甘油脱水酶催化机制的研究成为新的热点. 本文比较源自 *K. pneumoniae* 和 *C. butyricum* 中 GDHt 对辅酶 B₁₂的依赖性,并从生物信息学角度找出辅酶依赖型和不依赖型甘油脱水酶的异同点.

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 菌株. 肺炎克氏杆菌(*K. pneumoniae*, DSM2026),丁酸梭状芽孢杆菌(*C. butyricum*, VPI1718),由德国生物技术研究中心惠赠. (2) 试剂. 辅酶 B₁₂, 盐酸 3-甲基-2-苯并咪唑酮脒(MBTH),购自美国 Sigma 公司;其余试剂均为国产分析纯. (3) 生物学数据库. NCBI, PDB, SMART 等. (4) 应用软件. Cluster X, Molsoft ICM-Pro, Phylip 等.

1.2 方法

1.2.1 GDHt 的酶活测定方法 (1) 预处理. 将保存于 -20 °C 的 *K. pneumoniae* 和 *C. butyricum* 经过活化、扩大培养和发酵后,离心收集菌体,并采用超声波细胞破碎法(1 s 内超声 0.6 s, 间歇 0.4 s)破碎;然后,将离心悬浮液,上清液即为无细胞抽提液,用于酶活性分析. 其中, *C. butyricum* 培养的整个过程都在严格厌氧条件下进行.

(2) 测定方法. GDHt 催化甘油脱水生成的醛类,其与 MBTH 反应形成的复合物可用紫外分光光度法进行测定. 采用 Toraya 等建立的 MBTH(3-甲基-2-苯并咪唑酮脒烟酸盐)法测定 GDHt 的活性.

收稿日期: 2009-02-11

通信作者: 方柏山(1957-),男,教授,主要从事合成生物学的研究. E-mail: fangbs@hqu.edu.cn

基金项目: 国家高技术研究发展(863)计划项目(2006AA020103); 国家自然科学基金资助项目(20676048, 30770059)

(3) 反应体系. 适量无细胞抽提液, $0.12 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘油, $0.035 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钾缓冲液, $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, 选择性地添加 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 辅酶 B₁₂, 总体积为 1 mL. 在 37 °C 下反应一定时间后, 加入 1 mL 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸钾缓冲液 (pH = 3.6) 以终止反应; 然后, 加入 0.5 mL 的 0.1% MBTH, 于 37 °C 下保温 15 min, 加入 1 mL 水, 于 305 nm 下测定其吸光度值.

1.2.2 生物信息学比较 (1) 一级结构比较. 从生物数据库 NCBI 上搜索得到辅酶依赖型和不依赖型 GDHt 的氨基酸序列, *K. pneumoniae* 中 GDHt 氨基酸序列的 NCBI 登陆号为 U60992, *C. butyricum* 中 GDHt 的 NCBI 登陆号为 AY112989. 利用 NCBI 数据库的 BLAST (两条序列对齐) 功能 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 提交辅酶依赖型 GDHt 的 α , β , γ 亚基和不依赖型 GDHt 及其再激活酶基因序列; 搜索其相似序列和区域, 并对辅酶不依赖型 GDHt 的整个数据库进行相似性分析. 在此基础上, 选取相似性较高的几条序列, 利用 Cluster X 软件进行多序列比对, 以寻找保守区域.

(2) 蛋白质结构域搜索. 利用 SMART 数据库搜索 GDHt 及其再激活酶结构域, 所得结构域同时提供相关连接, 如结构域功能、分布范围, 以及是否具有已知空间结构.

(3) 酶分子空间结构的重叠分析. 从 PDB 数据库上搜索并下载辅酶依赖型和不依赖型 GDHt 的晶体结构, *K. pneumoniae* 中 GDHt 晶体结构的 PDB 登陆号为 1MMF, *C. butyricum* 中 GDHt 晶体结构的 PDB 登陆号为 1R9D. 利用 Molsoft ICM-Pro 软件对其 3 级结构进行空间位置的重叠, 以衡量其空间构象的相似性.

(4) 酶的亲缘性分析. 利用软件 Phylip, 建立包括 *K. pneumoniae* 和 *C. butyricum* 的 GDHt 在内的进化树, 分析两者亲缘性.

2 结果与讨论

2.1 GDHt 辅酶依赖性的比较

在有氧条件下, 分别测定添加与不添加辅酶的 GDHt 酶活, 结果如图 1 所示. 实验发现, *K. pneumoniae* 中 GDHt 在辅酶 B₁₂ 存在下, 表现出的酶活为 $13.70 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$, 而不添加辅酶则没有活性, 反应 10 min 后终止. 由于 *C. butyricum* 中 GDHt 对氧气较敏感, 所以在有氧条件下测量其酶活时需通入去氧剂.

在不同的反应终止时间, 发现随着 GDHt 在氧气中暴露时间越长, 酶活丧失越多 (终止时间为 1 min 时, 可近似看作厌氧). 从图 1 可看出, *C. butyricum* 的 GDHt 在添加与不添加辅酶 B₁₂ 时, 酶活相差较小.

2.2 一级结构的序列分析

在 NCBI 服务器上使用 BLAST 程序中的 BLOSUM62 矩阵, 空位开放罚分和空位扩展罚分分别为 11 和 1, 对两序列进行对齐分析, 结果如图 2 所示. 图 2 显示, 此两条序列间没有相似的序列及区域.

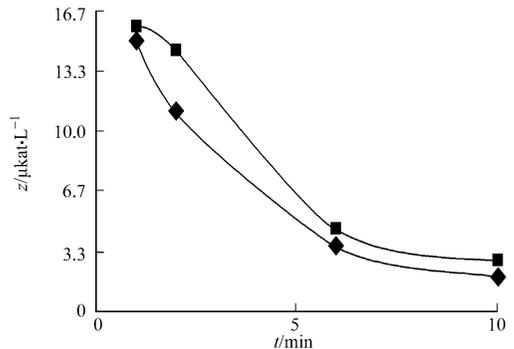


图 1 氧气对 *C. butyricum* 中 GDHt 酶活的影响

Fig. 1 Effect of oxygen on the activity of GDHt from *C. butyricum*

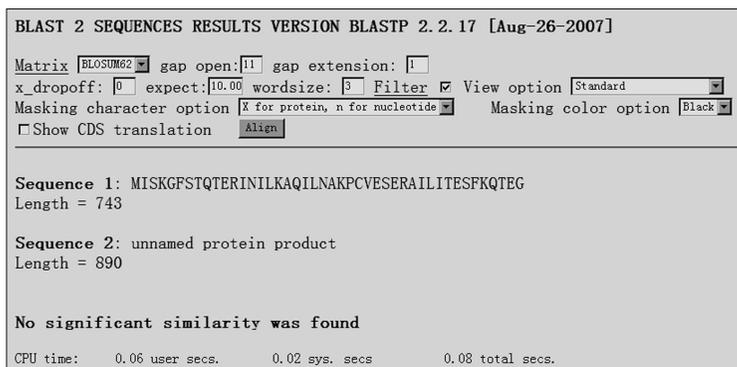


图 2 两条序列对齐结果

Fig. 2 Alignment of the two sequences

利用综合性软件 Molsoft ICM-Pro 计算辅酶依赖型 GDHt 的 α 亚基和不依赖型 GDHt 完全对齐时相同碱基仅为 19%, 结果如图 3 所示. 由于两序列同源性较小, 而辅酶依赖型 GDHt 的催化机制已得到较透彻的研究, 在此, 以不依赖型 GDHt 为探索的重点.

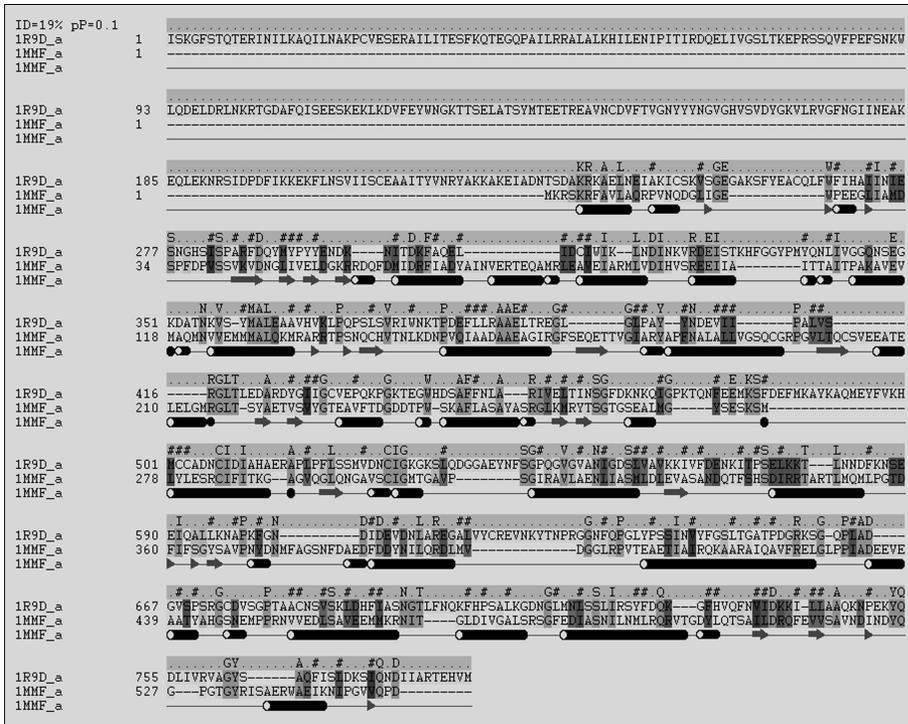


图 3 Molsoft ICM-Pro 计算两序列的同源性结果

Fig. 3 Calculation of homology between the two sequences by Molsoft ICM-Pro

在 NCBI 服务器上使用 BLAST 程序, 从 SWISS-PORT 蛋白质序列数据库中搜索辅酶不依赖型 GDHt 的相似序列, 结果如图 4 所示. 图 4 中列出的最高分值的击中项, 每一行显示一条蛋白质序列. 从左到右依次是数据库编号、序列名称、序列长度, 然后是两个仅与技术有关的分值, 末尾行是阈值 E , E 值由高到低. 搜索使用的是 BLOSUM 62 矩阵, 空位开放罚分和空位扩展罚分分别为 8 和 2, 其中设定阈值 E 为 0.1.

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
pdb 1R8W A Chain A, Native Structure Of The B12-Independent G...	1546	0.0
gb ABW38375.1 glycerol dehydratase [Clostridium sp. IBUN 13A]	1540	0.0
gb ABX56860.1 glycerol dehydratase [Clostridium sp. IBUN 158B]	1540	0.0
ref YP_877303.1 pyruvate formate-lyase [Clostridium novyi NT...]	1247	0.0
ref YP_878877.1 pyruvate formate-lyase [Clostridium novyi NT...]	1041	0.0
ref NP_781591.1 formate acetyltransferase 2 [Clostridium tet...]	1028	0.0
ref YP_878969.1 pyruvate formate-lyase [Clostridium novyi NT...]	1023	0.0
ref YP_961832.1 pyruvate formate-lyase [Shewanella sp. W3-18...]	995	0.0
ref YP_001311127.1 pyruvate formate-lyase [Clostridium beije...]	957	0.0
ref ZP_02040253.1 hypothetical protein RUMGNA_01017 [Ruminoc...]	952	0.0
ref YP_356813.1 glycerol dehydratase [Pelobacter carbinolicu...]	927	0.0
ref ZP_01962384.1 hypothetical protein RUMOB_00097 [Ruminoc...]	924	0.0
ref YP_425991.1 Pyruvate formate-lyase [Rhodospirillum rubru...]	922	0.0
ref ZP_00925323.1 COG1882: Pyruvate-formate lyase [Escherichia...]	919	0.0
ref NP_756397.1 hypothetical protein c4537 [Escherichia coli...]	919	0.0
ref YP_531045.1 pyruvate formate-lyase [Rhodopseudomonas pal...]	914	0.0
gb ABC25539.1 glycerol dehydratase [Roseburia inulinivorans]	900	0.0
ref ZP_02089676.1 hypothetical protein CLOBOL_07253 [Clostri...]	892	0.0
ref ZP_02089659.1 hypothetical protein CLOBOL_07236 [Clostri...]	686	0.0
ref YP_001558291.1 pyruvate formate-lyase [Clostridium phyto...]	648	0.0
ref ZP_01372386.1 pyruvate formate-lyase [Desulfitobacterium...]	617	7e-175
ref NP_462994.1 putative pyruvate formate lyase II [Salmonel...]	600	2e-169
ref YP_001454570.1 hypothetical protein CKO_03043 [Citrobact...]	599	2e-169
ref ZP_00924841.1 COG1882: Pyruvate-formate lyase [Escherich...]	598	4e-169
ref ZP_00736216.1 COG1882: Pyruvate-formate lyase [Escherichia...]	598	4e-169

图 4 辅酶不依赖型 GDHt 对库检索结果

Fig. 4 Retrieval of B₁₂-independent GDHt in the NCBI database

由图 4 可看出, 来自不同菌种的 PFL 序列联配分值较高. 选取几种同源性较高的酶, 利用 ClusterX 软件进行多序列比对. 找出图 5 所示的保守区域, 其中富含半胱氨酸残基. 活性中心的半胱氨酸残基遇氧容易形成 S-S 键, 失去转移电子的能力. 这可能是该酶对氧气较敏感.

		: * * * : * . * * * * * * . .
1	DhaB	HDGFGILRTIWFVFGCSMSCLWCHNPESQDIKPOVMFNKN
2	Pf1C	NDGEGILRTVVFVFGCPHLCPWCAHPESISGKIQTVRREA
3	TutE	QDGGFGFRTTVFLVFGCPPLRCPWCHNPETQKVGKEYVYNRD
4	NrdG	VNCGFGRCTIIFVFGCVHECPGCMNKSTWRVNSGQPFTK-

图 5 ClusterX 多序列比对搜索到的保守区域
Fig.5 Conserved region found by multiple sequence alignments

K. pneumoniae 中的 GDHt 是 6 个亚基 α , β_1 , β_2 , 通过非共价键的疏水相互作用缔合成的异六聚体, 其中两个 α , β , γ 异型三聚体组成了一个对二聚体. α 亚基含一个丙糖磷酸异构酶 (TIM) 桶状结构, 把活性中心围在中间. β_{12} 位于 TIM 桶状结构和 β 亚基之间, 如图 6 所示^[6].

C. butyricum 中的 GDHt 是一个由单亚基通过非共价键的疏水相互作用缔合成的二聚体, 它的两个单体呈几乎完美的中心对称, 其单体由 10 个 β/α 桶状结构组成, 氨基酸 C 端 (黄色标记) 作为高度保守区, 是与再激活酶结合的位点, 如图 7 所示^[7]. 从图 6, 7 可看出, 辅酶不依赖型 GDHt 在氧气中暴露时间越长, 酶活丧失越多. 其中, DhaB 为辅酶不依赖型 GDHt 基因, Pf1C, TutE, NrdG 的 NCBI 登陆号分别为 Ec (P32675), T1 (AAC38452), Ec (P39329).

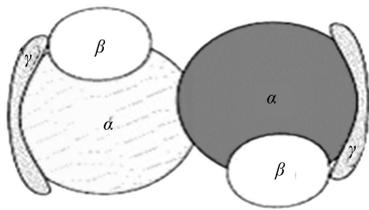


图 6 *K. pneumoniae* 甘油脱水酶的拓扑结构图
Fig.6 Opology of GDHt from *K. pneumoniae*

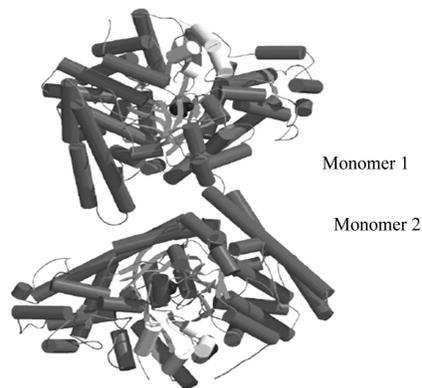


图 7 *C. butyricum* 甘油脱水酶的晶体结构
Fig.7 Crystal structure of GDHt from *C. butyricum*

2.3 蛋白质结构域的搜索结果分析

在 SMART 搜索到的辅酶不依赖型 GDHt 的结构域, 如表 1 所示. 从表 1 可知, 该蛋白有一段相似于 PFL 家族的结构域和一段 gly-Radical 结构域. 搜索辅酶不依赖型 GDHt 的再激活酶 (GDHt-AE) 时, 发现其属于“Radical-SAM”家族, 如表 1 所示.

Heidi 等^[8] 指出, 这一家族的成员均可催化一系列不依赖辅酶的化学反应, 但是每一种酶根据底物不同而需要不同的辅因子, 并有着相同的催化机理. 在搜索辅酶依赖型 GDHt 时, 未发现有显著的结构域.

2.4 三级结构重叠分析

利用 Molsoft ICM-Pro 软件, 对辅酶依赖型和不依赖型 GDHt 的 3 级结构进行最大限度重叠, 结果如图 8 (a) 所示. 虽然两者都为二聚体, 但是空间结构相差较大, 重叠部分较少.

引入均方根偏差 D_{RMS} 作为衡量重叠效果的参数, D_{RMS} 越大, 重叠部分越少. 两者重叠的 D_{RMS} 值为 27.104 749. 作为比较, 同时重叠来自 *Clostridium novyi* 的 PFL 与不依赖型 GDHt, 两者相似性为 78%, D_{RMS} 为 9.607 466, 如图 8 (b) 所示.

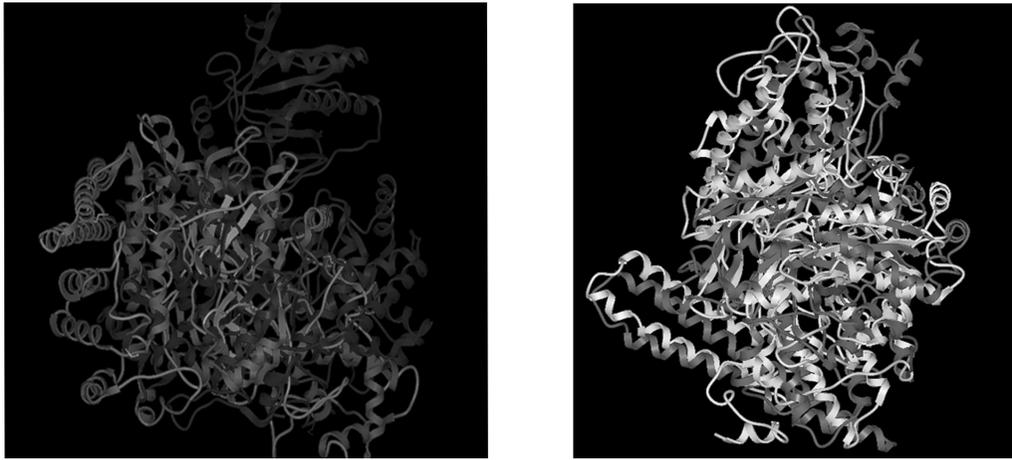
2.5 进化树的建立

选择两种酶对库检索时产生的序列, 利用 Phylip 软件生成进化树, 如图 9 所示. 图 9 中, 黑框标记为 *K. pneumoniae* 和 *C. butyricum* 中 GDHt. 从图 9 可看出, 辅酶不依赖型 GDHt 与一类 PFL 及同样不依赖辅酶的 GDHt 有较近的亲缘性, 同属于 Radical-SAM 家族^[4,9].

表 1 SMART 的结构域搜索结果

Tab.1 Domains of GDHt found by SMART

	结构域	开始	结束	E
辅酶	PFL	9	649	8.3×10^{-143}
	Gly_Radical	665	769	8.2×10^{-22}
再激活酶	Radical_SAM	26	74	8.8×10^{-15}
	Fer4	51	74	6.6×10^{-4}
	Fer4	79	102	2.4×10^{-3}



(a) 辅酶依赖型和不依赖型 GDHt

(b) 不依赖型 GDHt 与 PFL

图8 三级结构重叠结果

Fig. 8 Overlapping of tertiary structures

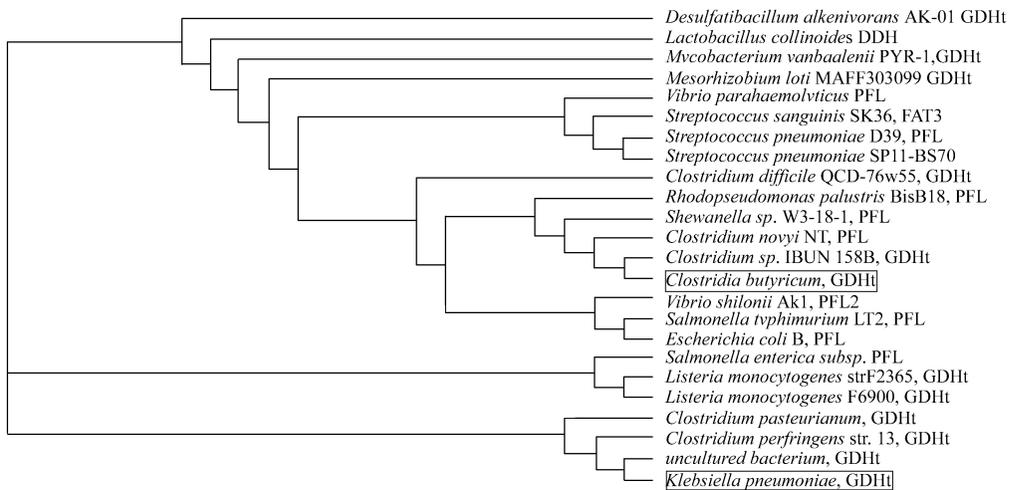


图9 两种 GDHt 的进化树分析

Fig. 9 Analysis of the phylogenetic tree of the two enzymes

从多序列比对得到的一段 C^{*} C^{*} C^{*} C 看出, 此结构域与 Layer 等^[10]报道的 *Coproporphyrinogen-III ox idase* 中与 [4Fe-4S] 簇匹配的 3~4 个彼此间隔的半胱氨酸残基基团 C^{*} C^{*} C^{*} C 匹配. 因此, 推测辅酶不依赖型 GDHt 借助 SAM 断裂所产生的活性 5'-脱氧腺苷自由基替代 B₁₂ 起作用; 而辅酶依赖型 GDHt 与一类同样依赖辅酶 B₁₂ 的 GDHt 亲缘性较近. 当辅酶 B₁₂ 与 GDHt 结合时, 其 Co-C 键发生均裂, 产生一个 5'-脱氧腺苷自由基, 引发一系列电子转移催化反应^[11], 而两者之间亲缘性较远.

综上所述, 来自 *K. pneumoniae* 中依赖辅酶 B₁₂ 和 *C. butyricum* 中不依赖辅酶, 其甘油脱水酶相似性较低. 从两序列的对齐结果看, 两条序列同源性较低. 从 SMART 搜索结果可看出, *C. butyricum* 中不依赖辅酶的甘油脱水酶及其再激活酶分别属于 gly-Radical 和 Radical-SAM 家族, 多序列比对得到的一段富含半胱氨酸残基 C^{*} C^{*} C^{*} C 的保守序列正是其共同特征.

因此, B₁₂-independent GDHt 的催化机制同于 Radical-SAM 家族其他成员, 即借助 S-adenosylmethionine 代替辅酶 B₁₂ 起作用.

3 结束语

研究结果可为 *C. butyricum* 中的甘油脱水酶基因工程改造, 得到兼性厌氧, 产不依赖辅酶的 GDHt 提供理论依据. 下一步研究是, 通过定点突变等技术, 改造此保守区域的半胱氨酸残基, 使其在具备稳定酶活的同时对氧气有一定的抵御能力.

参考文献:

- [1] BIEBL H, MENZEL K, ZENG A P, et al. Microbial production of 1, 3-propanediol[J]. *Microbiology And Biotechnology*, 1999, 52(3): 289-297.
- [2] 王剑锋, 刘海军, 修志龙, 等. 生物转化生产 1, 3-丙二醇的研究进展[J]. *化学通报*, 2001, 64(10): 621-625.
- [3] STUBBE J, VAN DER DONK W A. Protein radicals in enzyme catalysis[J]. *Chemical Reviews*, 1998, 98(7): 705-762.
- [4] GUNHILD L, DIRK W H, DIETER J, et al. Structure and function of radical SAM enzymes[J]. *Chemical Biology*, 2004, 8(5): 468-476.
- [5] CHEEK J, BRODERICK J B. Adenosylmethionine-dependent iron-sulfur enzymes: Versatile clusters in a radical new role[J]. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2001, 6(3): 209-226.
- [6] LIAO D I, DOTSON G, TURNER Jr I, et al. Crystal structure of substrate free form of glycerol dehydratase[J]. *Inorg Biochem*, 2003, 93(1/ 2): 84-91.
- [7] O'BRIEN J R, RAYNAUD C, CROUX C, et al. Insight into the mechanism of the B₁₂-independent glycerol dehydratase from *Clostridium butyricum*: Preliminary biochemical and structural characterization[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(16): 4635-4645.
- [8] SOFIA H J, CHEN G, HETZLER B G, et al. Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: Functional characterization using new analysis and information visualization methods[J]. *Nucleic Acid Research*, 2001, 29(5): 1097-1106.
- [9] HENSHAW T F, CHEEK J, BRODERICK J B. The [4Fe-4S]¹⁺ cluster of pyruvate formate-lyase activating enzyme generates the glyxyl radical on pyruvate formate-lyase: EPR-detected single turnover[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2000, 122(34): 8331-8332.
- [10] LAYER G, VERFURTH K, MAHLITZ, et al. Oxygen-independent coproporphyrinogen- III oxidase HemN from *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(37): 34136-34142.
- [11] TORAYA T. Radical catalysis of B₁₂ enzymes: Structure, mechanism, inactivation, and reactivation of diol and glycerol dehydratase[J]. *Journal of Cell and Molecular Life Science*, 2000, 57(1): 106-127.

Comparison between the B₁₂-Dependent and Independent Glycerol Dehydratase

YANG Zhong-li, FANG Bai-shan, YU Jin-cong,
WANG Qing-hua, LI Zi-jun

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology Fujian Province, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: In this paper, the coenzyme B₁₂ dependence of glycerol dehydratase between *Klebsiella pneumoniae* and *Clostridia butyricum* was compared. Their differences and similarities were analyzed with bioinformatics. Results showed that these two enzymes belonged to two different families with low similarities. Searching the SMART database and the result also shows that the B₁₂-independent glycerol dehydratase from *Clostridia butyricum* and its reactivated enzyme belong to glyxyl-Radical family and Radical-SAM family respectively, and the conserved sequence which is rich in half-cysteine obtained by multiple alignments is their common feature.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; *Clostridia butyricum*; coenzyme; glycerol dehydratase; vitamin B₁₂; dependence

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 刘源岗)