

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.201705016



应用残基相互作用探讨嗜热 和嗜冷酶稳定机制

葛慧华, 蔡征文, 张光亚

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 为探寻嗜热酶和嗜冷酶稳定性的机制, 提出一种基于蛋白分子内残基相互作用的方法. 结果表明: 在一级结构上, 差异不明显的同源嗜热、常温、嗜冷酶在不同残基相互作用次数时, 存在非常显著的差异; 嗜热酶中, 高相互作用次数的氨基酸及氨基酸类型与其同源常温酶差异最大, 嗜热酶减少低相互作用次数的氨基酸, 而增加高相互作用次数的氨基酸是其适应高温的普遍机制, 嗜冷酶也存在类似趋势, 但不如嗜热酶明显; 同一个氨基酸在不同相互作用次数时, 作用存在差异, 这可解释现有一些相互矛盾的实验结果.

关键词: 残基相互作用; 稳定性机制; 嗜热酶; 嗜冷酶; 特征值提取

中图分类号: Q 554.903; Q 811.212 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5013(2018)02-0214-07

Insight into Stability Mechanism of Thermophilic and Psychrophilic Enzymes Using Residue Interaction Networks

GE Huihua, CAI Zhengwen, ZHANG Guangya

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: A novel method is proposed to explore the stable mechanism of thermophilic and psychrophilic enzymes based on the residue interaction network. The results clearly indicated that the thermophilic-mesophilic-psychrophilic homologs having no significant differences in sequence showed great significant differences according to various numbers of interactions in terms of amino acid composition. The amino acids and amino acid kinds varied remarkably at high degree of interactions between the thermophilic and mesophilic enzymes. At the same time, the thermophilic enzymes preferred amino acids with more interactions at the expense of those with less interaction, which may be a general rule for their adaptation to high temperature. The trends also existed in the psychrophilic enzyme, although it was not so obvious. Besides, the amino acid had contrary contributions to the stability of the enzymes at different degrees of interactions. That might be the reason that some references had opposite results.

Keywords: residue interaction network; mechanism of stability; thermophilic enzyme; psychrophilic enzyme; feature extraction

为了解酶分子进化、热稳定性机制及酶分子催化的上限温度等^[1], 许多从事生物、化学及物理的研究者将嗜热微生物的嗜热酶作为模式分子进行实验研究. 同样, 由于嗜冷酶在洗涤剂、食品及医药等工业上有诸多应用^[2], 嗜冷酶的稳定机制也一直是研究者感兴趣的课题, 除常规“湿实验”外, 理论计算是探讨嗜热酶及嗜冷酶稳定性机制的强有力手段, 现已知一些因素对这两种酶的稳定性的贡献^[1-5]. 其

收稿日期: 2017-05-10

通信作者: 张光亚(1975-), 男, 教授, 博士, 主要从事酶学与酶工程的研究. E-mail: zhgygh@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家海洋局第三海洋研究所海洋生物遗传资源重点实验室开放课题资助项目(HY201501)

中,氨基酸组成在嗜热(嗜冷)蛋白与其同源常温蛋白之间存在差异^[5-6].此外,在不同二级结构及溶剂分子可及性区域,这两种蛋白也与它们的同源常温蛋白存在较为明显的氨基酸组成差异^[7-8].基于氨基酸组成,研究者建立了各种较高精度识别这几种蛋白或预测蛋白质热稳定性的方法^[9-11].然而,在研究酶分子对高温或低温适应过程中,鲜有文献依据氨基酸之间相互作用数量来区分这几种蛋白在氨基酸组成上的差异.由于算法的不断改进,使通过残基相互作用表征蛋白的结构成为可能^[12].本文严格选取 20 对同源的嗜热、常温、嗜冷酶,用于理解并阐述嗜热及嗜冷蛋白稳定性的机制.

1 材料和方法

1.1 数据来源

20 对嗜热、常温、嗜冷酶的 PDB ID 号主要来自文献[13-15],按照如下 2 个步骤进行筛选:1) 剔除文献中标识错误的蛋白类型,为避免系统发育带来的影响,均选取来源于微生物的酶,舍弃植物或动物酶;2) 若文献中缺少嗜热(嗜冷)酶,先从 PDB 数据库中通过 BLAST 寻找,若返回多个结果,则优先挑选相似度高、分子量接近、晶体结构解析分辨率更高的;若未返回结果,则舍弃原始记录.最后得到 20 对同源的酶.

1.2 氨基酸残基相互作用的计算

在氨基酸残基相互作用网络计算过程中,单个氨基酸被看作是节点,而氨基酸之间的物理-化学相互作用被看作是边界,以此构成蛋白质结构的网络.其定义的相互作用主要有:氢键、离子键、二硫键、范德华力、 π - π 堆积及 π -阳离子相互作用,这基本囊括了蛋白分子内除肽键以外的其他所有相互作用.

残基相互作用类型的距离及能量的定义参考文献[16],所使用服务器为 RING 2.0^[16](<http://protein.bio.unipd.it/ring/>).将上述 60 个酶的结构文件提交到该服务器,输出的结果中包含参与形成相互作用氨基酸及氨基酸相互作用次数等多种相关信息,提取其中的信息用于后续的计算及分析.

酶分子内残基相互作用的可视化及定位某一特定相互作用次数氨基酸在分子内的空间结构,是通过软件 Cytoscape^[17]及与之经 RINalyzer 偶联的 UCSF Chimera^[18]实现.

1.3 偏差的计算

两种类型酶中,氨基酸组成的偏差(嗜热酶和常温酶/嗜冷酶和常温酶之间的偏差)采用类似文献[19]的方法,其定义为 $d_{x,M,i}^n = \frac{c_{x,i}^n - c_{M,i}^n}{c_{M,i}^n}$.其中: x 分别为嗜热酶(T)和嗜冷酶(P); M 为常温酶; i 为 20 种氨基酸; n 为氨基酸相互作用次数; $d_{x,M,i}^n$ 为两种极端酶与常温酶在残基相互作用次数为 n 时,氨基酸 i 的偏差; $c_{x,i}^n$ 为嗜热(嗜冷)酶中在残基相互作用次数为 n 时,氨基酸 i 所占的百分比; $c_{M,i}^n$ 为常温酶中在残基相互作用次数为 n 时,氨基酸 i 所占的百分比.

除单个氨基酸之外,也统计了不同氨基酸类型的偏差,方法与之类似.参考文献[19-20]把氨基酸分成 15 种类型,包括:带电的(DEKHR)、脂肪族(ILV)、芳香族(FHWY)、极性的(DERKQN)、中性的(AGHPSTY)、疏水性的(CVLIMFW)、带正电(HKR)、带负电(DE)、微小的(ACDGST)、小的(EHILKMNPQV)、大的(FRWY)、含硫的(CM)、酰胺的(NQ)、刚性的(WYFCIVHLMA)和柔性的(GTRSNQDPEK).文中氨基酸采用国际通用的单字母缩写.

为考察同一类型酶在不同残基相互作用次数时,氨基酸出现频率的偏差,其定义方式同上.以嗜热酶为例,定义为 $d_{T,i}^n = \frac{c_{T,i}^n - c_{Ts,i}}{c_{Ts,i}}$.其中: Ts 为嗜热酶蛋白序列; $c_{Ts,i}$ 为嗜热酶一级结构序列中氨基酸 i 所占的百分比.若 $|d_{T,i}^n|$ 越大,表明嗜热酶中在残基相互作用次数为 n 时,氨基酸 i 的偏差越大;若 $|d_{T,i}^n|$ 趋近于 0,则几乎不存在偏差.常温和嗜冷酶定义与之相似.

2 结果与分析

2.1 嗜热、常温、嗜冷酶不同残基相互作用次数的差异

分别统计这 20 对同源蛋白序列中氨基酸的数量,并以常温酶为参照,计算嗜热和嗜冷酶与其氨基酸总数的偏差,结果如图 1 所示.图 1 中: ϵ 为氨基酸组成的偏差; n 为非共价相互作用次数; TvM 为

嗜热酶和常温酶氨基酸总数的偏差; PvM 为嗜冷酶和常温酶氨基酸总数的偏差; 横坐标 s 对应的值为 TvM 和 PvM 在序列氨基酸总数的偏差. 由图 1 可知: 三者序列的氨基酸数量上几乎没有差别, 嗜热、常温、嗜冷酶的氨基酸总数分别为 7 090, 7 029, 6 927. 而三者中没有与其他氨基酸发生相互作用的氨基酸数量有一定差异, 嗜热和嗜冷酶中均少于常温酶(横坐标为 0); 类似情况也存在于相互作用次数为 1 的氨基酸总数上. 这表明虽然它们的长度非常接近, 但嗜热和嗜冷酶中参与相互作用的氨基酸总数量更多, 且常温酶中相互作用次数少的氨基酸更多, 这应该和其适应各自环境有关. 而相互作用次数在 2~6, 以及 8 和 9 时, 三者之间差异也不明显; 差异较为显著的是在相互作用次数较多时(10~13), 嗜热酶中氨基酸数量明显高于常温酶, 而嗜冷酶也存在类似的情况(除相互作用次数为 12), 这表明在分子大小接近的同源酶中, 嗜热酶中同其他氨基酸发生相互作用次数较多的氨基酸数量远高于其同源的常温酶. 嗜冷酶趋势类似, 但略有不同, 这些高相互作用次数的氨基酸可能对其适应极端温度有重要贡献. 文献[21]报道, 嗜热和嗜冷酶中氢键和离子对的数量明显高于其同源常温蛋白, 而造成这种差异也许就是这些高频相互作用的氨基酸所导致的.

三种酶在序列中氨基酸组成差异不明显, 为进一步了解氨基酸在不同相互作用次数时的差异, 统计它们在不同次数时的频率, 并计算与常温酶的偏差. 当偏差 $|d| > 0.4$ 时, 该氨基酸被定义为差异显著, 结果如表 1 所示.

表 1 不同残基相互作用次数下 3 种类型酶差异显著的氨基酸类型

Tab. 1 Significant amino acids and amino acid types in different numbers of residue interaction in thermophilic, mesophilic and psychrophilic proteins

作用次数	显著的氨基酸及类型 嗜热 vs 常温		显著的氨基酸及类型 嗜冷 vs 常温	
	氨基酸 ($ d > 0.4$)	氨基酸类型 ($ d > 1$)	氨基酸 ($ d > 0.4$)	氨基酸类型 ($ d > 1$)
1	-F, H, -M, -V, W, Y	AR, NE, LA	-F, -M, A, C, H, N	NE, TI, RI
2	C, I, K, N, Q, W	HY, TI, SU, RI	-M, -W, C, I	AR, HY, TI, -LA, SU, RI
3	-C, -H, M, -Q, Y	无	M	SM
4	-C, -Q, F, W	AR, LA	C, F, W	AR, HY, LA, RI
5	-G, C, Y	SU, RI	-W, C, N	NE, TI, FL
6	-T, -Y, E	CH, -NE, NC, -TI	E, Q	PO
7	-G, K, -N, -P	-TI, -FL	-E, A, C, K, S	HY, TI, SU, RI, FL
8	-C, -N, -P, -Q, -S, E, K, T, V, W	CH, TI, -AM	-S, -N, E, P, T, V	CH, NE, TI, SM, FL
9	-Q, -T, C, D, I, N, V	CH, AL, PO, HY, NC, SM, RI	-C, -L, -T, -W, I, V	AL, -NE, -TI, SM, -SU
10	-K, I, M, Q, Y	AL, HY, SM, SU, RI	-K, -N, -V, I, L, M, R, Y	-CH, AL, -PO, HY, SM, SU, RI, -FL

表 1 中: CH 为带电氨基酸; AL 为脂肪族氨基酸; AR 为芳香族氨基酸; PO 为极性氨基酸; NE 为中性氨基酸; HY 为疏水氨基酸; PC 为带正电氨基酸; NC 为带负电氨基酸; TI 为微小氨基酸; SM 为小氨基酸; LA 为大氨基酸; SU 为含硫氨基酸; AM 为酰胺氨基酸; RI 为刚性氨基酸; FL 为柔性氨基酸; 单字母为 20 种氨基酸, 均采用国际通用的单字母缩写进行表示. 由表 1 可知: 在不同作用次数时, 三者之间的差别开始显现. 这表明通过定义残基相互作用次数, 可以更明确了解这些酶在适应温度过程中氨基酸的差异.

对嗜热和常温酶而言, 当残基相互作用次数为 8 时, 二者之间的差异最大, 呈现显著差异的氨基酸高达 10 个, 占氨基酸总数量的 50%. 其中, 嗜热酶中较多的是 Glu, Lys, Thr, Val, Trp; 较少的是 Cys, Asn, Pro, Gln, Ser. 由表 1 还可知: 同一氨基酸在不同残基作用次数时, 在两种酶中所占百分比变化较

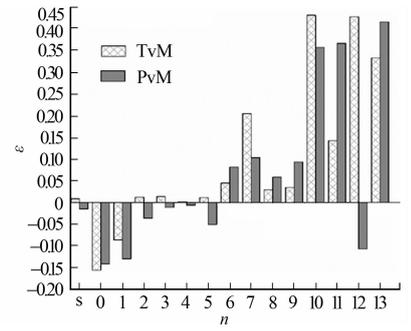


图 1 3 种类型酶氨基酸总数比例的偏差

Fig. 1 Amino acid deviation of three kinds of enzymes

大,如 Cys 在作用次数为 2,5,9 时,其在嗜热酶中较多;而在作用次数为 3,4,8 时,则反之.类似的还有 Gln,Thr,Tyr 等,这也从某种程度上解释了一些基于序列的氨基酸组成出现相互矛盾的现象^[22-23];而 Trp 则在相互作用次数为 1,2,4,8 时,均在嗜热酶中所占百分比更高,类似的还有 Ile(相互作用次数为 2,9,10),这与文献报道吻合^[24].

此外,统计了嗜热和常温酶中氨基酸类型的差异(偏差 $|d|>1$ 时,该氨基酸类型被定义为差异显著).在残基相互作用次数为 3 时,二者之间未出现差异显著的氨基酸类型;而在残基相互作用次数为 9 时,二者出现差异的氨基酸类型最多,高达 7 种,占总数量的 46.7%,这些类型包括带电的、脂肪族、极性的、疏水的、带负电的、小的及刚性的.带电的、疏水的氨基酸类型与蛋白质热稳定性密切相关,这已有一定共识^[24].

虽然多数研究者认为蛋白分子的刚性有助于提高其热稳定性,但存在一定争论^[25].文中结果更支持刚性有助于嗜热酶热稳定这一结果,这是由于所有差异显著的刚性氨基酸均是嗜热蛋白更多(残基相互作用次数为 2,5,9,10).

类似的,对嗜冷和常温酶而言,当残基作用次数为 10 时,二者之间差异显著的氨基酸最多,高达 8 种,占总数的 40%.而相互作用次数为 1,8,9 时,二者差异显著的氨基酸数量次之,均达 6 个,占总数量的 30%.同样,一些氨基酸在不同残基作用次数时,在两种酶中所占百分比变化趋势相反,如 Cys 在作用次数为 1,2,4,5,7 时,其在嗜冷酶中较多;而在作用次数为 9 时,则反之.类似的还有 Trp,Thr,Lys 等,这也能解释文献中相互不一致的结果^[26-27].例如,Ile 在相互作用次数为 2,9,10 时,均在嗜冷酶中所占百分比更高,Ile 由于侧链的分支结构,更容易同其他氨基酸发生相互作用,也更容易填充蛋白分子疏水核心区域,有助于在低温下的稳定^[27],文中结果进一步证实 Ile 的这种稳定作用主要体现在相互作用次数较多的时候.

同样,也统计了嗜冷和常温酶中氨基酸类型的差异,在残基相互作用次数为 10 时,二者出现差异的氨基酸类型最多,高达 8 种,占总数量的 53.3%,这些氨基酸类型包括脂肪族、疏水的、小的、含硫的、刚性的、带电的,极性的和柔性的.其中,前 5 种在嗜冷酶中较多,后 3 种则较少.文献^[28]报道嗜冷蛋白中含有更多疏水的、脂肪族、小的氨基酸、更少带电和极性氨基酸,文中结果与之相符.刚性氨基酸的增加,则可能是嗜冷酶的又一个稳定机制,这是由于刚性氨基酸在残基相互作用次数为 1,2,4,7,10 时,均出现且均是嗜冷酶较多.最近,文献报道低温酶表面刚性可以调控焓和熵的平衡,这使得嗜冷酶在较低温度下催化效率显著高于其同源常温酶^[29].

为进一步了解 3 种酶在氨基酸组成上的差异,将残基相互作用次数分成低、中和高三种.其中,次数在 1~4 之间为低(I);次数在 5~8 之间为中(II);次数大于或等于 9 为高(III).统计了 3 种酶在 3 个区间氨基酸组成的差异,结果如图 2 所示.图 2 中: ϵ 为氨基酸组成的偏差; ω 为氨基酸种类.由图 2 可知:嗜热(嗜冷)与常温酶的氨基酸组成的差异主要集中在高相互作用次数区间.对嗜热和常温酶而言,在高相互作用区间,Asp,Glu,Ile,Val 在嗜热酶中明显高于常温酶,二者在低相互作用区间和基于序列一样,均无差异显著的氨基酸.嗜冷和常温酶也存在类似情况,在高相互作用区间,嗜冷酶中 Asp,Ile,

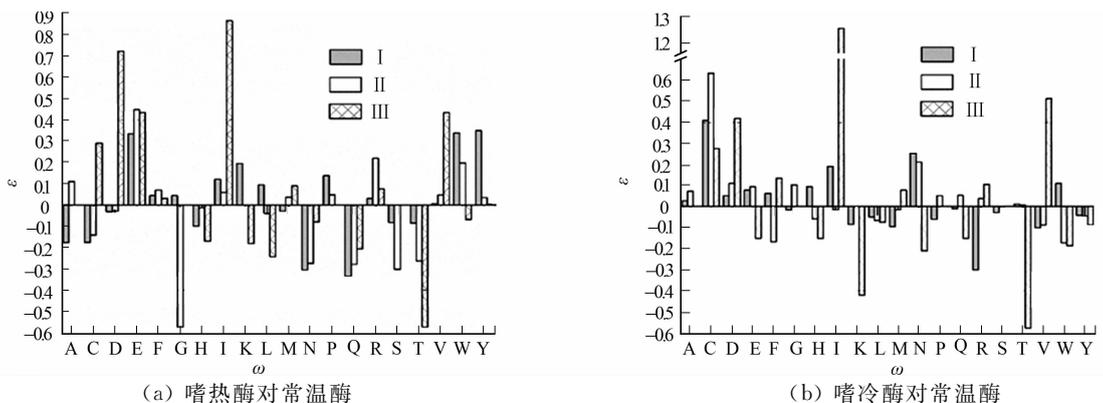


图 2 不同相互作用区间氨基酸的分布

Fig. 2 Amino acid distribution in different interaction regions

Val 显著增多,而 Lys 和 Thr 显著减少,这与文献[26-28,30]报道吻合.

2.2 嗜热、常温、嗜冷酶在不同残基相互作用次数下氨基酸使用偏好

以 3 种酶序列中氨基酸组成为参照,分别计算它们各自在不同残基相互作用次数时,氨基酸使用的偏差,统计出其中偏差最大和最小的氨基酸各 4 个,结果如表 2 所示.表 2 中:矩形框表示嗜热酶与常温酶存在显著差异的氨基酸;下划线表示嗜冷酶与常温酶存在显著差异的氨基酸.由表 2 可知:对 3 种酶中偏差最大的 4 种氨基酸而言,它们在残基相互作用次数为 10 时,高频使用的氨基酸一样,在次数为 9 时,差异也很小,也就说明 Phe, Trp 和 Tyr 很容易在分子内同其他氨基酸形成多种相互作用,它们在不同特性的酶中有相似的使用特性及偏好,这可能与其中存在共轭环状分子有关.而在中、低残基相互作用次数时,3 种蛋白表现出不同的偏好,其中,嗜热酶和常温酶差别最大的是作用次数为 2 时,4 种氨基酸中有 3 个不一样;而嗜冷酶则在相互作用次数为 3 时,4 种氨基酸均不一样,在作用次数为 2 时,也有 3 个氨基酸存在差别;对 3 种酶中偏差最小的 4 种氨基酸而言,在残基相互作用次数为 8 时,嗜热和常温酶之间氨基酸的偏好没有差别,而在次数为 4 和 6 时,差异较大,均有 3 个氨基酸不一样;而嗜冷和常温酶则都或多或少存在差异,其中,次数为 4 时,差异最大,次数为 2 时,差异最小.如同 Chou 等^[31]在统计不同二级结构中,氨基酸出现频率计算每个氨基酸形成各种二级结构的偏好,以及 Costantini 等^[32]统计的在不同类型蛋白中氨基酸在二级结构中偏好存在一定差异一样.若能收集足够量的样本,也可以统计在 3 种酶中不同残基相互作用次数时氨基酸使用的偏好,为了解嗜热和嗜冷酶稳定性机制提供全新的视角^[33-34].

表 2 不同残基作用次数下 3 种类型酶的氨基酸使用偏好

Tab. 2 Biased amino acid according to number of interactions in three kinds of enzymes

相互作用次数	偏好最大的 4 个氨基酸			偏好最小的 4 个氨基酸		
	嗜热	常温	嗜冷	嗜热	常温	嗜冷
1	G, P, F, M	G, P, W, Y	G, P, F, M	A, D, T, K	D, A, R, Q	Q, D, <u>N, K</u>
2	G, S, P, F	G, C, T, I	G, <u>W, M, P</u>	Q, V, N, E	R, Q, K, V	Q, R, K, <u>N</u>
3	S, P, F , W	S, C, M, W	<u>F, D, T, A</u>	R, L, Q, V	H, R, K, L	H, <u>V, C, K</u>
4	W, D, N, V	A, W, F, D	<u>V, K, A, W</u>	I, Y, L, R	I, H, S, C	<u>I, P, Q, T</u>
5	C, Q , G, V	I, L, G, V	V, <u>W, G, L</u>	S, D, K , E	A, S, E, D	D, E, <u>H, Y</u>
6	I, G, F, M	C, G, I, Y	I, <u>M, G, C</u>	D, E, Y , K	K, W, T, A	W, T, D, <u>N</u>
7	F, Y , L, W	L, I, F, W	<u>C, L, W, I</u>	N, E, A, V	Q, N, H, E	Q, A, D, H
8	M, W, H , Y	Y, F, M, C	Y, <u>W, L, F</u>	N, V, Q, K	V, N, Q, K	K, V, E, I
9	W, Y, F, C	W, F, Y, M	F, Y, W, <u>I</u>	K, R, Q, V	I, K, N, R	K, V, L , N
10	F, W, Y, H	W, F, H, Y	W, Y, F, H	K, I , V, L	M, Q, V, L	L, Q, <u>I, N</u>

3 结束语

提出一种基于蛋白分子内残基相互作用的全新视角,探寻嗜热和嗜冷蛋白稳定性的分子机制.这种方法更为敏感,能够分辨出在序列上相差不明显的同源蛋白在不同残基相互作用次数时的分布差异.同时,该方法能直接锁定对蛋白(酶)分子内对其稳定性起重要作用的氨基酸,为酶分子改造及全新设计提供重要信息.此外,后续的研究可以尝试使用这种新方法作为提取蛋白分子结构特征值的手段,它在蛋白分子稳定性预测、蛋白亚细胞定位、膜蛋白质预测等生物信息学领域中发挥积极的作用.

参考文献:

- [1] VIEILLE C, ZEIKUS G J. Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2001, 65(1): 1-43. DOI:10.1128/MMBR.65.1.1-43.2001.
- [2] RADDADI N, CHERIF A, DAFFONCHIO D, et al. Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes

- and extremolytes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(19): 7907-7913. DOI: 10.1007/s00253-015-6874-9.
- [3] SHOKROLLAHZADE S, SHARIFI F, VASEGHI A, *et al.* Protein cold adaptation: Role of physico-chemical parameters in adaptation of proteins to low temperatures[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2015, 383(30): 130-137. DOI: 10.1016/j.jtbi.2015.07.013.
- [4] 王雪芹, 丁彦蕊, 牟兆琳, 等. 超氧化物歧化酶氨基酸网络与耐热性的关系研究[J]. *生物物理学报*, 2014, 30(2): 146-156. DOI: 10.3724/SP.J.1260.2014.40009.
- [5] YANG Lingling, TANG Shukun, HUANG Ying, *et al.* Low temperature adaptation is not the opposite process of high temperature adaptation in terms of changes in amino acid composition[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2015, 7(12): 3426-3433. DOI: 10.1093/gbe/evv232.
- [6] TANG Hua, CAO Renzhi, WANG Liming, *et al.* A two-step discriminated method to identify thermophilic proteins[J]. *生物数学学报: 英文版*, 2017(4): 123-130. DOI: 10.1142/S1793524517500504.
- [7] PACK S P, YOO Y J. Protein thermostability: Structure-based difference of amino acid between thermophilic and mesophilic proteins[J]. *Journal of Biotechnology*, 2004, 111(3): 269-277. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2004.01.018.
- [8] FUKUCHI S, NISHIKAWA K. Protein surface amino acid compositions distinctively differ between thermophilic and mesophilic bacteria[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 309(4): 835-843. DOI: 10.1006/jmbi.2001.4718.
- [9] 张光亚, 方柏山. 基于氨基酸组成分布的嗜热和嗜冷蛋白随机森林分类模型[J]. *生物工程学报*, 2008, 24(2): 302-308. DOI: 10.13345/j.cjb.2008.02.007.
- [10] GROMIHA M M, SURESH M X. Discrimination of mesophilic and thermophilic proteins using machine learning algorithms[J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2008, 70(4): 1274-1279. DOI: 10.1002/prot.21616.
- [11] 张光亚, 葛慧华, 方柏山. 采用 BP 算法的多层感知机模型的蛋白识别[J]. *华侨大学学报(自然科学版)*, 2009, 30(2): 388-394. DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.2009.02.0161.
- [12] ALBERT R, JEONG H, BARABASI A L. Error and attack tolerance of complex networks[J]. *Nature*, 2001, 340(1/2/3): 378-382. DOI: 10.1038/35019019.
- [13] PAREDES D I, WATTERS K, PITMAN D J, *et al.* Comparative void-volume analysis of psychrophilic and mesophilic enzymes: Structural bioinformatics of psychrophilic enzymes reveals sources of core flexibility[J]. *BMC Structural Biology*, 2011, 11(1): 42. DOI: 10.1186/1472-6807-11-42.
- [14] SHOKROLLAHZADE S, SHARIFI F, VADEGHI A, *et al.* Protein cold adaptation: Role of physico-chemical parameters in adaptation of proteins to low temperatures[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2015, 383(30): 130-137. DOI: 10.1016/j.jtbi.2015.07.013.
- [15] GIANESE G, BOSSA F, PASCARELLA S. Comparative structural analysis of psychrophilic and meso- and thermophilic enzymes[J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2002, 47(2): 236-249. DOI: 10.1002/prot.10084.
- [16] PIOVESAN D, MINERVINI G, TOSATTO S. The RING 2.0 web server for high quality residue interaction networks[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44: W367-W374. DOI: 10.1093/nar/gkw315.
- [17] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, *et al.* Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. *Genome Research*, 2003, 13(11): 2498-2504. DOI: 10.1101/gr.1239303.
- [18] PETERSEN E F, GODDARD T D, HUANG C C, *et al.* UCSF Chimera: A visualization system for exploratory research and analysis[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2004, 25(13): 1605-1612. DOI: 10.1002/jcc.20084.
- [19] JAHANDIDEH S, ASADABADI E B, ABDOLMALEKI P, *et al.* Protein psychrophilicity: Role of residual structural properties in adaptation of proteins to low temperatures[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2007, 248(4): 721-726. DOI: 10.1016/j.jtbi.2007.06.019.
- [20] SMITG D K, RADIVOJAC P, OBRADOVIC Z, *et al.* Improved amino acid flexibility parameters[J]. *Protein Science*, 2003, 12(5): 1060-1072.
- [21] TRONELLI D, MAUGINI E, BOSSA F, *et al.* Structural adaptation to low temperatures: Analysis of the subunit interface of oligomeric psychrophilic enzymes[J]. *FEBS Journal*, 2007, 274(17): 4595-4608. DOI: 10.1111/ps.0236203.
- [22] YOKOTA K, SATOU K, OHKI S. Comparative analysis of protein thermostability: Differences in amino acid con-

- tent and substitution at the surfaces and in the core regions of thermophilic and mesophilic proteins[J]. *Science and Technology of Advanced Materials*, 2006, 7(3): 255-262. DOI: 10. 1016/j. stom. 2006. 03. 003.
- [23] XU Zhen, LIU Yunqing, YANG Yunliu, *et al.* Crystal structure of D-Hydantoinase from *Burkholderia pickettii* at a resolution of 2.7 Angstroms: Insights into the molecular basis of enzyme thermostability[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(14): 4038-4049. DOI: 10. 1128/JB. 185. 14. 4038-4049. 2003.
- [24] ZHOU Xinxin, WANG Yibo, PAN Yuanji, *et al.* Differences in amino acids composition and coupling patterns between mesophilic and thermophilic proteins[J]. *Amino Acids*, 2008, 34(1): 25-33. DOI: 10. 1007/s00726-007-0589-x.
- [25] KARSHIKOFF A, NILSSON L, LADENSTEIN R. Rigidity versus flexibility: The dilemma of understanding protein thermal stability[J]. *FEBS Journal*, 2015, 282(20): 3899-3917. DOI: 10. 1111/febs. 13343.
- [26] JAHANDIDEH S, ABDOLMALEKI P, JAHANDIDEH M, *et al.* Sequence and structural parameters enhancing adaptation of proteins to low temperatures[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2007, 246(1): 159-166. DOI: 10. 1016/j. jtbi. 2006. 12. 008.
- [27] JAHANDIDEH M, BARKOOIE S M H, JAHANDIDEH S, *et al.* Elucidating the protein cold-adaptation: Investigation of the parameters enhancing protein psychrophilicity[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2008, 255(1): 113-118. DOI: 10. 1016/j. jtbi. 2008. 07. 034.
- [28] METPALLY R P R, REDDY B V B. Comparative proteome analysis of psychrophilic versus mesophilic bacterial species: Insights into the molecular basis of cold adaptation of proteins[J]. *BMC Genomics*, 2009, 10(1): 11. DOI: 10. 1186/1471-2164-10-11.
- [29] ISAKSEN G V, ÅQVIST J, BRANDSDAL B O. Enzyme surface rigidity tunes the temperature dependence of catalytic rates[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(28): 7822-7827. DOI: 10. 1073/pnas. 1605237113.
- [30] YANG Lingling, TANG Shukun, HUANG Ying, *et al.* Low temperature adaptation is not the opposite process of high temperature adaptation in terms of changes in amino acid composition[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2015, 7(12): 3426-3433. DOI: 10. 1093/gbe/evv232.
- [31] CHOU P Y, FASMAN G D. Conformational parameters for amino acids in helical, beta-sheet, and random coil regions calculated from proteins[J]. *Biochemistry*, 1974, 13(2): 211-222.
- [32] COSTANTINI S, COLONNA G, FACCHIANO A M. Amino acid propensities for secondary structures are influenced by the protein structural class[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 342(2): 441-451. DOI: 10. 1016/j. bbrc. 2006. 01. 159.
- [33] OHSHIDA T, HAYASHI J, SATOMURA T, *et al.* First characterization of extremely halophilic 2-deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase[J]. *Protein Expression and Purification*, 2016, 126: 62-68. DOI: 10. 1016/j. pep. 2016. 05. 009.
- [34] DICK M, WEIERGRÄBER O H, CLASSEN T, *et al.* Trading off stability against activity in extremophilic aldolases[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 17908. DOI: 10. 1038/srep17908.

(责任编辑: 钱筠 英文审校: 刘源岗)