

非解肌栖热菌 HG102 耐热 β -糖苷酶的结构与功能研究

The Structure-function Relationship of Thermostable β -glycosidase from the Thermophilic Eubacterium *Thermus nonproteolyticus* HG102

杨雪鹏^{1,2}, 杨寿钧¹, 韩北忠², 金城^{1*}

YANG Xue-Peng^{1,2}, YANG Shou-Jun¹, HAN Bei-Zhong² and JIN Cheng^{1*}

1. 中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100080

2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083

1. State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

2. College of Food Science and Nutritional Engineering, Beijing 100083, China

摘 要 非解肌栖热菌 HG102 耐热 β -糖苷酶为 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状结构, 是具有水解功能和转糖苷功能的单体酶。该酶可以作为一个很好的模型来研究糖苷酶的反应机制、底物特异性和耐热的分子基础。根据对该酶的晶体结构解析和同家族酶的结构比较, 推测 Glu164 和 Glu338 分别是质子供体和亲核基团两个活性位点; 在 α -螺旋 N 端第一位的脯氨酸和蛋白质外周的精氨酸是耐热机制的关键位点和关键氨基酸残基。为确定这些氨基酸残基的功能, 通过基因定点突变的方法分别把 Glu164、Glu338、Pro316、Pro356、Pro344 和 Arg325 置换成 Gln、Ala、Gly、Ala、Phe 和 Leu, 同时还对 Pro316 和 Pro356 进行了双置换。突变酶经过纯化得到电泳纯, 用 CD 光谱进行了野生酶和突变酶的结构比较。通过突变酶的酶功能和酶学性质分析, 结果表明 Glu164 和 Glu338 分别是质子供体和亲核基团, 亲核基团的突变酶 TnglyE338A 可以合成混合型糖苷键寡糖类物; 在 α -螺旋 N 端第一位的 Pro316 和 Pro356 以及在蛋白质外周形成离子键的 Arg325 均是对耐热性有贡献的关键氨基酸残基。

关键词 β -糖苷酶, 转糖苷活性, 热稳定性, 定点突变

中图分类号 Q814 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)01-0084-08

Abstract β -Glycosidase (Tngly) from the thermophilic eubacterium *Thermus nonproteolyticus* HG102, which is a thermostable monomeric protein and adopts the $(\beta/\alpha)_8$ barrel fold, is an excellent model system to be investigated for the thermostable mechanism, activity and substrate specificity. Here, based on the analysis of structural basis for thermostability of Tngly (Wang *et al.*, 2003) and comparison of other proteins structure of homofamily, Glu164 and Glu338 may act as proton donor and nucleophile in the hydrolysis reaction respectively; proline located at N1 of α -helix and arginine which can form ion link may contribute to the thermostability. We aim to further identify the critical sites and the amino acid residue(s) responsible for the activity, the thermal stability and the substrate specificity. Mutations had been constructed by site-directed mutagenesis. They are Glu164Gln, Glu338Ala, Pro316Gly, Arg325Leu, Pro344Phe, Pro356Ala and Pro316Gly/Pro356Ala. All mutant proteins were purified to SDS-PAGE purity. Changes in the conformations were examined by means of CD. The Glu338Ala mutant showed no detectable hydrolysis activity, but can synthesize oligosaccharides, as expected for the residue acting as the nucleophile of the reaction. The

Received: June 17, 2004; Accepted: July 26, 2004

This work was supported by CAS Innovation Program(No.0103).

* Corresponding author. Tel: 86-10-62587206; E-mail: jinc@sun.im.ac.cn

中国科学院知识创新工程项目基金资助(No. 0103)。

Glu164 acts as the general acid/base catalyst in the hydrolysis reaction. Changes in stabilities of mutants compared with wild-type were determined by means of heat inactivity experiment. These results indicate that the amino acid residue of proline that is located at N1 positions of α -helix, and Arg325 that form salt bridge between α -helices 5 and α -helices 6, are the critical sites to protein thermostabilization.

Key words β -glycosidase, transglycosylation, thermostability, site-directed mutagenesis

β -糖苷酶(E.C. 3.2.1.21)生物来源广泛,可以水解多种 β 构型的糖苷键,具有广阔的应用前景^[1]。嗜热细菌 *Thermus nonproteolyticus* HG102 的 β -糖苷酶 Tngly 基因已克隆、表达并进行了酶学性质的研究^[2]。Tngly 属于糖苷酶家族 1,具有葡萄糖苷酶、半乳糖苷酶、岩藻糖苷酶和甘露糖苷酶活性,在高温下还具有转糖苷活性,它的最适水解反应温度和 pH 值分别为 90℃和 5.6,在 90℃时,酶的半衰期为 2.5 h。Tngly 晶体结构解析表明,该酶为 (β/α)₈桶状结构,分别位于第四 β -sheet 和第七 β -sheet 上的 Glu164 和 Glu338,可能为水解反应时的质子供体和亲核基团^[3]。

β -糖苷酶可用来合成寡糖^[5,6],但反应要在有机相中并需要高浓度的糖基供体。Mackenzie 等人将 *Agrobacterium* sp. β -葡萄糖苷酶的亲核基团谷氨酸残基突变成甘氨酸,使得突变的酶只能合成糖苷键,不再具有水解功能,从而能使寡糖的产率达到 90%^[7]。 β -糖苷酶 Tngly 可以在 65℃下水解乳糖或纤维二糖生成三糖^[2],说明酶的活性中心适合转糖苷反应,可用来合成寡糖,置换耐热 β -糖苷酶的亲核基团来合成寡糖更具有优势。已知结构的蛋白质大约 10%为 (β/α)₈桶状结构,或叫 TIM 结构^[4],因此以 Tngly 作为模型来研究 (β/α)₈桶状结构的稳定机制非常有意义。文献报道,在 α -helix N 端第一位脯氨酸的刚性结构和蛋白质外周精氨酸形成的离子键可能对蛋白质热稳定性有一定的贡献^[8]。

本实验在 Tngly 晶体结构的基础上,用基因定点突变的方法置换 Tngly 的氨基酸残基 Glu164 和

Glu338 来鉴定 β -糖苷酶 Tngly 水解反应时的质子供体和亲核基团;置换 Pro316、Arg325、Pro344 和 Pro356 来探讨酶的耐热分子基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒:大肠杆菌 (*E. coli*) AS1.1739 [K12r⁻ Δ (lacIPOZY) \times 74]在中国科学院微生物研究所购买,重组质粒 pHY(在 pUC18 载体 *Hind*Ⅲ克隆位点含有 β -糖苷酶目的基因)为本实验室构建。BMH71-18 购自 Promega 公司。

1.1.2 培养基及培养条件:LB 培养基为大肠杆菌完全培养基,固体培养基加入 1.5%的琼脂粉。重组菌培养时加入氨苄青霉素(100 μ g/mL),培养温度为 37℃;诱导时液体培养基加入 1% (W/V)乳糖,固体培养基涂布 4 μ L IPTG(200 mg/mL)40 μ L X-gal(20 mg/mL)。

1.1.3 酶及生化试剂:定点突变试剂盒 GeneEditorTM *in vitro* Site-Directed Mutagenesis System Kit 购自 Promega 公司;T4 Polynucleotide Kinase 购自 Promega 公司;溶菌酶购自华美公司;CMP-3-Fluoro-neuraminic Acid 购自 Calbiochem-Novabiochem 公司;胰化蛋白胨 (TRYPTONE)和酵母提取物 (YEAST EXTRACT)购自 OXOID 公司;IPTG、X-gal、ONPG 和乳糖购自 Sigma 公司;蛋白质分子量标准购自华美公司;其它试剂均为分析纯试剂。

所用诱变寡核苷酸为上海生工公司合成,见表 1。

表 1 置换氨基酸位点及其在蛋白质二级结构中的位置和相应的诱变寡核苷酸设计
Table 1 Oligonucleotides and mutagenic position in protein

Mutation	Position in protein	Mutagenic oligonucleotides
Glu164Gln	No.4, β -sheet	5'-ACCCTGAAC CAG CCCTGGTGC-3'
Glu338Ala	No.7, β -sheet	5'-TACATCACGG GCA AACGGGGCC-3'
Pro316Gly	No.6, α -helix N1	5'-GGGAGGTCTAC GGC GAGGGGCTT-3'
Arg325Leu	Ion link	5'-CTCTTGAAG CTC CTCGGCCGG-3'
Pro344Phe	No.7, β -sheet	5'-GGGCGCCTACT TCG ACCTCTGGAC-3'
Pro356Ala	No.7, α -helix N1	5'-GTGGAGGAC GCC GAGCGGGTG-3'
Pro316Gly/	No.6, α -helix N1/	5'-GGGAGGTCTAC GGC GAGGGGCTT-3'
Pro356Ala	No.7, α -helix N1	5'-GTGGAGGAC GCC GAGCGGGTG-3'

Bold and underlined nucleotides are the mutations sites.

1.2 方法

1.2.1 基因定点突变:以重组质粒 pHY 单链 DNA 为模板,在诱变寡核苷酸介导下,用定点突变试剂盒相应的试剂进行突变和筛选。筛选出单菌株提取质粒送交 TaKaRa Biotechnology (Dalian) 测序鉴定突变结果。

1.2.2 突变基因的表达和蛋白质纯化:用突变的重组质粒转化到大肠杆菌 (*E. coli*) AS1.1739,从过夜培养的 Amp-LB 平皿上挑取单菌落,接种到 5 mL 液体 LB (Amp 100 $\mu\text{g/mL}$) 培养 12 h, 1% 接种量接种到 100 mL Amp-LB 液体培养基中培养 12 h; 再以 1% 的接种量接种到 4 L Amp-LB 液体培养基 (5 L 发酵罐) 中培养,加入 1% 的乳糖诱导, 37 $^{\circ}\text{C}$, 300 r/min 的搅拌速度,通无菌空气,培养 28 h。

收集发酵罐中的 4 L 发酵液 (4 $^{\circ}\text{C}$, 6000g, 15 min) 离心,菌体用磷酸缓冲液 (50 mmol/L, pH6.6) 悬浮;冰浴超声破碎,离心去除细胞碎片;在 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴恒温加热 15 min,离心 (4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000g, 15 min) 取上清。向上清液中缓慢加入固体硫酸铵,收集 30% ~ 60% 饱和度的沉淀,溶于磷酸缓冲液中 (50 mmol/L, pH6.6),用同种缓冲液透析过夜。除盐的粗酶冻干浓缩后,在 ÄKTA FPLC 蛋白质纯化系统上用 DEAE 离子交换柱进行纯化,缓冲液 A 为磷酸缓冲液 (50 mmol/L, pH6.6),缓冲液 B 为 1 mol/L NaCl 溶于磷酸缓冲液 (50 mmol/L, pH6.6),洗脱条件为在 5 个柱体积内 B 溶液比例上升到 30%,测酶活和 SDS-PAGE 检测目的蛋白纯度,收集合并酶活峰,用冻干机冻干浓缩,用蒸馏水溶解冻干的酶蛋白,在磷酸缓冲液 (50 mmol/L, pH6.6) 中透析,再用 Superdex G-75 分子筛柱层析纯化,洗脱液为磷酸缓冲液 (50 mmol/L, pH6.6)。以上步骤均在常温下进行。

1.2.3 酶活测定:0.1 mL 4 mmol/L ONPG, 0.1 mL pH5.8 磷酸缓冲液, 0.7 mL H_2O ,混匀后于 85 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 5 min,加入 0.1 mL 酶液,反应 10 min,加入 4 mL Na_2CO_3 溶液终止反应,420 nm 测定吸光值。此条件下每分钟产生 1 μmol 对硝基苯酚的酶量为一个酶活单位。

1.2.4 蛋白含量测定:以牛血清白蛋白为标准,Lowry 法测定。

1.2.5 CD 光谱分析和同源建模:一定浓度的各种酶蛋白分别加入测量杯中,把测量杯放入光谱仪 (JASCO J-715) 中,用 200 ~ 250nm 的光进行扫描。用蛋白质分子量和氨基酸残基数目计算残基椭圆度。

同源建模在 <http://www.expasy.org/swissmod/>

SWISS-MODEL.html 网站上完成^[8,9,10]。

1.2.6 转糖苷反应:突变酶 TnglyE338A 和各种底物在 65 $^{\circ}\text{C}$, pH6.8 下反应 2 h,薄层层析检测。

1.2.7 薄层层析 (TLC):展开剂为正丁醇:乙酸:水 = 1:2:1;显色剂为苯胺:二苯胺:磷酸 = 5:5:1 (显色范围为 10 μg)。

在数据的测定当中都进行 3 次或 3 次以上试验,误差范围在 5% 以内。

2 结果

2.1 基因定点突变构建突变酶基因

以单链重组质粒为模板,由诱变寡核苷酸和选择寡核苷酸介导突变和筛选突变基因^[11]。突变质粒与野生质粒大小相同。测序结果显示突变质粒 pHYE164Q 编码 164 位上的 Glu 碱基密码子 GAG 突变为 Gln 的密码子 CAG;突变质粒 pHYE338A 编码 338 位上的 Glu 碱基密码子 GAA 突变为 Ala 的密码子 GCA;突变质粒 pHP316G 编码 316 位上的 Pro 碱基密码子 CCC 突变为 Gly 的密码子 GGC;突变质粒 pHP356A 编码 356 位上的 Pro 碱基密码子 CCC 突变为 Ala 的密码子 GCC;突变质粒 pHP344F 编码 344 位上的 Pro 碱基密码子 CCC 突变为 Phe 的密码子 CTT;双突变质粒 pHP316G/P356A 编码 316 位和 356 位上的 Pro 碱基密码子 CCC 分别突变为 Gly 的密码子 GGC 和 Ala 的密码子 GCC;突变质粒 pHYR325L 编码 325 位上的 Arg 碱基密码子 CGC 突变为 Leu 的密码子 CTC。

2.2 突变基因的表达和突变酶的纯化

含有突变基因的质粒分别转化到大肠杆菌 AS1.1739 中,经乳糖诱导,发酵罐大量培养,目的基因得到大量表达,将表达产物分别经加热分离、硫酸铵分级沉淀、DEAE 和 Superdex G75 分子筛层析纯化,得到电泳纯,纯度均达 90% 以上 (图 1);除 TnglyE164Q 和 TnglyE338A 外,其他突变酶在 85 $^{\circ}\text{C}$ 时的比活均与野生酶相当 (表 2)。

2.3 突变酶与野生酶结构的比较

野生和突变纯酶由 CD 光谱仪直接扫描得到观察值 (mdeg),把观察值换算成平均残基椭圆度 (mean residue ellipticity)。结果显示突变酶与野生酶结构相同,如图 2 (因为 CD 光谱图曲线拥挤,这里只显示两个突变酶和野生酶的 CD 光谱图)。说明单个氨基酸残基的置换没有改变蛋白质的折叠。同源建模结果也显示置换位点的结构域与野生酶相同 (见图 3),这与 CD 光谱结果一致。

表 2 突变纯酶的比活
Table 2 The specific activity of purified Tnglys

Purified proteins	Wild-type	Tngly E338A	Tngly E164Q	Tngly P316G	Tngly P356A	Tngly P344F	Tngly P316G/P356A	Tngly R325L
Specific activity/(u/mg)	17.6	0	0.98	20.0	21.0	17.9	24.0	24.0

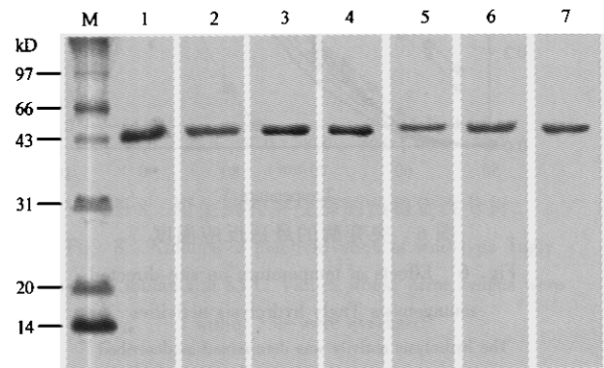


图 1 SDS-PAGE 分析野生酶 Tngly 和突变酶的纯化
Fig. 1 SDS-PAGE pattern of purified Tnglys
1: Tngly E164Q; 2: Tngly P344F; 3: Tngly P316G;
4: Tngly P356A; 5: Tngly R325L; 6: Tngly P316G/P356A;
7: wild-type; M: standard marker proteins.

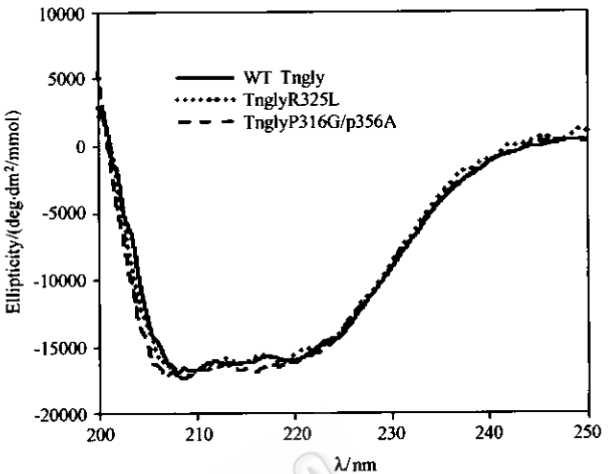


图 2 突变酶和野生酶 CD 光谱图
Fig. 2 Circular dichroic spectra of wild-type Tngly and two mutant TnglyR325L, TnglyP316G/P356A in the far-ultraviolet region

2.4 质子供体与亲核基团的确定

突变酶 TnglyE164Q 的比活是野生酶比活的 5.5%, 且几乎不受反应液 pH 值的影响(见图 4); 突变酶 TnglyE338A 检测不到水解活性, 在 CMP-3-F-Neu5Ac 和甘露糖为底物的情况下表现出转糖苷功能(见图 5), 用相应的糖苷酶 Tngly 和 α -2-(3,6)-NANase II 都没能把反应产物水解。根据以上结果确定 Glu164 为水解反应时的质子供体, 介导水的攻击, Glu338 为水解反应时的亲核基团, 其侧链羧基

The spectra were measured on a JASCO J-715 spectropolarimeter at 25°C. The protein concentration of wild-type Tngly was 0.1166mg/mL, the TnglyR325L was 0.053mg/mL, the TnglyP316G/P356A was 0.079mg/mL at pH6.6, 50 mmol/mol phosphoric acid buffer.

和底物形成共价复合物, 是双置换反应的关键步骤。突变酶 TnglyE338A 失去水解功能而只有转糖苷功能, 可作为糖苷合成酶用于寡糖的合成。

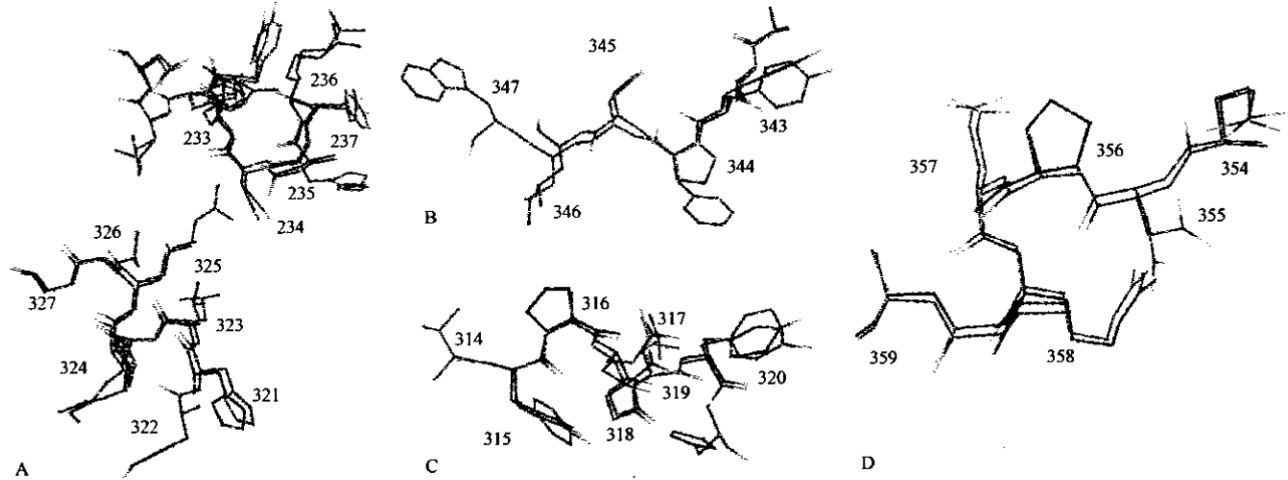


图 3 突变点的结构和野生酶的比较立体图
Fig. 3 Stereo drawings showing the mutant structure in the vicinity of the mutant sites
Wild-type and mutants structures are superimposed. A: Arg325L; B: P344F; C: P316G; D: P356A

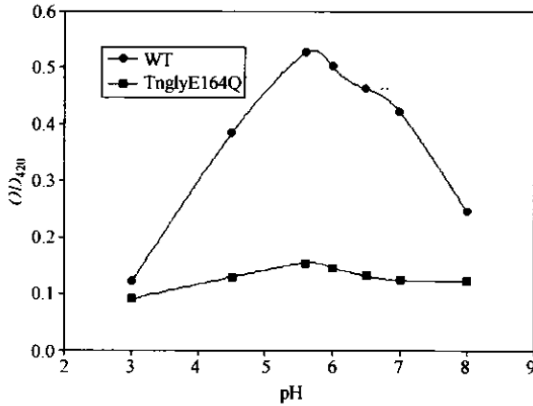


图 4 突变酶 TnglyE164Q 和野生酶的活性受反应液 pH 值的影响

Fig. 4 Comparison of the pH dependence on the ONPG substrate wild-type Tngly and TnglyE164Q at the same condition of reaction

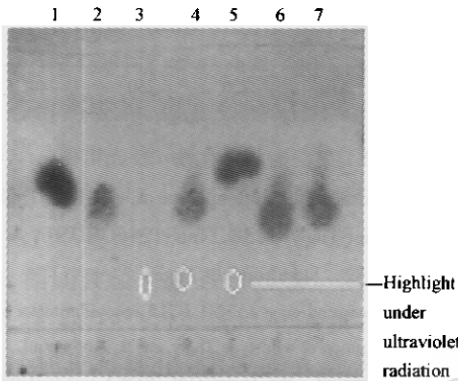


图 5 突变酶 TnglyE338A 的转糖苷反应 TLC 图谱

Fig. 5 Transglycosylation activity of mutant TnglyE338A at 65 °C, pH6.8

1:mannose; 2:sialic acid; 3:CMP-3-F-Neu5Ac; 4:mannose and CMP-3-F-Neu5Ac reacted with mutant TnglyE338A; 5:mannose and CMP-3-F-Neu5Ac with no enzyme; 6:production of reaction of lane4 reacted with wild-type Tngly; 7:production of reaction of lane4 reacted with α -2-(3, 6)-NANase II (reaction of condition rely on the enzyme of optimum condition).

2.5 热稳定性相关的突变酶酶学性质分析

2.5.1 最适温度: 在 50 ~ 95 °C 的温度范围内测定野生酶和突变酶的最适反应温度,发现突变酶 TnglyP344F 的最适反应温度与野生酶都为 90 °C,其它突变酶最适反应温度都有所下降(如图 6), TnglyP316G 和 TnglyP356A 最适反应温度大约为 87 °C, Tngly-P316G/P356A 和 TnglyR325L 最适反应温度大约为 85 °C。结果表明,位于第六 α -helix 的 N 端第一位的 P316、位于第七 α -helix 的 N 端第一位的 P356 和位于第六 α -helix 的 R325 置换都降低了酶蛋白的刚性结构,但在 Loop 区的 P344 对酶的结构刚性影响较小。

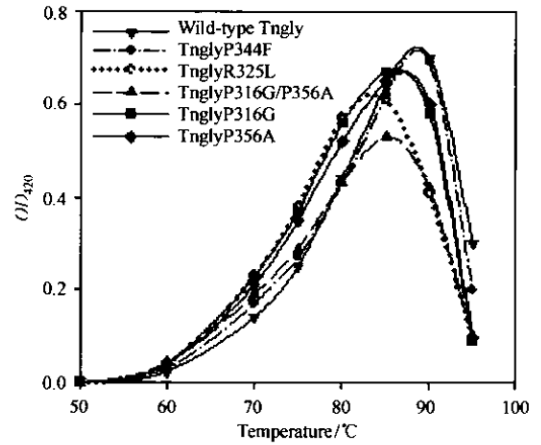


图 6 突变酶的最适反应温度

Fig. 6 Effects of temperature on site-directed mutagenesis Tngly hydrolysis activities
The hydrolysis activity was determined as described in Materials and Methods at different temperatures from 50 °C to 95 °C.

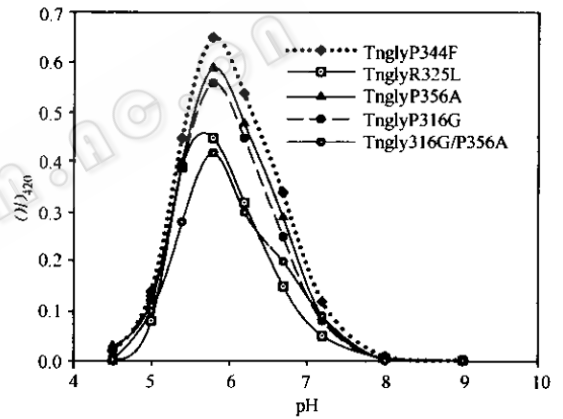


图 7 突变酶的最适反应 pH

Fig. 7 Effects of pH on site-directed mutagenesis Tngly hydrolysis activities
The hydrolysis activity was determined as described in Materials and Methods at different pH from 4.5 to 9.0.

2.5.2 最适 pH 值: 如图 7 所示,6 个突变酶的最适 pH 值都是大约 pH5.8,与野生酶相似。说明置换的氨基酸不影响酶活性中心的环境,也表明置换的点在蛋白的外周不影响酶蛋白质的活性。

2.5.3 热稳定性: 突变酶和野生酶在 85 °C 温浴不同的时间,然后测剩余酶活,当剩余酶活是原来的 50% 时,各种酶经历的时间 ($t_{1/2}$) 分别是野生酶 Tngly 63 min,突变酶 TnglyP344F 57 min, TnglyP316G 43 min, TnglyP356A 45 min, TnglyR325L 33 min 和 TnglyP316G/P356A 15 min(见图 8)。把各种酶在不同的温度温浴 15min 测定酶的剩余酶活,得出相似的结果, T_m 值是酶剩余 50% 活力时所对应的温度如图 9,结果

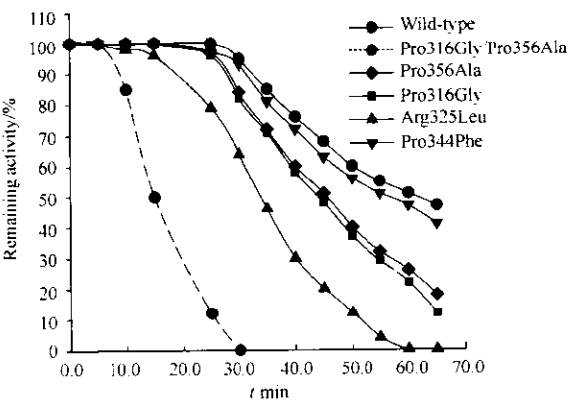


图 8 野生酶和突变酶的热稳定性分析

Fig. 8 Kinetics of inactivation of wild-type Tngly and its mutants at 85 °C. Values whose error ranges were within 5% were averaged

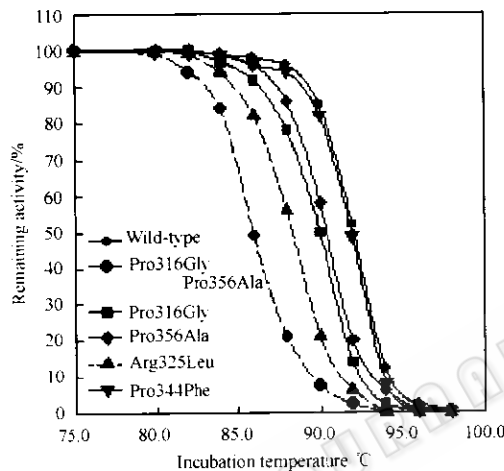


图 9 野生酶和突变酶的热稳定性分析

Fig. 9 Effect of temperature on the stability of wild-type Tngly and its mutants

Each purified enzyme was treated at different temperatures for 15 minutes. The remaining activities were expressed as percentages of the original activities. Values whose error ranges were within 5% were averaged.

显示野生酶和突变酶 TnglyP344F、Tngly-P316G、TnglyP356A、TnglyR325L、TnglyP316G/P356A 的 T_m 值分别是 94、93、91、91、89 和 86℃。以上结果表明位于第六 α -helix 的 N 端第一位的 P316 和位于第七 α -helix 的 N 端第一位的 P356 刚性结构及位于第六 α -helix 的 R325 所形成的离子键对酶蛋白的热稳定性有一定的贡献,而在 Loop 区的 P344 对蛋白质的稳定性影响较小。

2.5.4 突变酶米氏常数 (K_m) 和转化数 (k_{cat}) 的测定: 野生酶及突变酶可以水解 ONPGlc、ONPGal、ONP-GFuc、PNPGlc、PNPGal、PNPFuc 和 PNPMann 等多种底物,这里只选择 ONPGlc 作为底物来测定酶的动

力学常数,底物浓度由 2 mmol/L 到 40 mmol/L。结果显示动力学常数基本相同(见表 3),表明突变酶置换的氨基酸不影响酶的亲和性。

表 3 野生酶及其突变酶热稳定性和反应动力学常数

Table 3 Thermodynamic and kinetic Parameters for wild-type Tngly and its mutants

Protein	$t_{1/2}^a$ /min	T_m^b /°C	ΔT_m /°C	K_m^c /(mmol/L)	(k_{cat}/K_m) / $L/(mmol \cdot s)$
Wild-type	63 ± 0.5	94.0 ± 0.5	—	1.3	77.9
Pro316Gly	43 ± 0.5	91.0 ± 0.5	-3.0 ± 0.5	1.2	77.1
Pro356Ala	45 ± 0.5	91.5 ± 0.5	-2.5 ± 0.5	1.2	77.2
Pro344Phe	57 ± 0.5	93.0 ± 0.5	-1.0 ± 0.5	1.3	78.1
Arg325Leu	33 ± 0.5	89.0 ± 0.5	-5.0 ± 0.5	1.4	78.6
Pro316Gly/ Pro356Ala	15 ± 0.5	86.5 ± 0.5	-7.5 ± 0.5	1.4	78.2

a: Determined by kinetics of irreversible heat inactivity at 85 °C.
b: Melting temperature from Fig. 9.
c: Obtained by catalytic reaction of enzyme at optimum temperature.

3 讨论

糖苷酶家族 1 β -糖苷酶采用保留型双置换催化机制,在酶的活性部位存在两个重要的羧酸部分,一个质子化,称为质子供体,另一个发生离子化,称为亲核基团,所切糖苷键的氧原子被质子化的羧基攻击,糖苷键断裂,形成的碳正离子与离子化的另一个羧基以离子键或共价键的形式形成中间产物,此中间产物不稳定,当亲核试剂进行亲核攻击时,此中间产物不存在,取而代之的是一个新的糖苷键,当亲核试剂是水时,发生水解反应,当亲核试剂是醇或某个糖的羟基时,则发生转糖苷反应^[5,12]。质子供体在双置换当中起到酸/碱催化的双功能,在第一步提供质子,在第二步介导水的攻击^[13],亲核基团是形成酶与底物中间物的关键氨基酸残基。

Agrobacterium faecalis β -葡萄糖苷酶的质子供体和 *Sulfolobus solfataricus* β -糖苷酶两个活性位点的谷氨酸残基都已确定^[15,16]。目前,在糖苷酶家族 1 中除了葡萄糖糖苷酶外,质子供体和亲核基团两个活性位点都是谷氨酸,分别在第四 β -sheet 和第七 β -sheet 上。这两个活性位点氨基酸残基在家族 1 中很保守,靠近蛋白质 N 端是 T(F/L/M)NE(P/L/I),靠近 C 端是(I/V)TENG^[14]。在 Tngly 结构当中,E164 所在 -TLNEP-区域和 E338 所在 -ITENG-区域,分别位于第四 β -sheet 和第七 β -sheet 上,可推测 E164 和 E338 可能为 β -糖苷酶 Tngly 的两个活性位点,在水解反应当

中前者作为质子供体,后者作为亲核基团。Glu164和Glu338分别置换为Gln和Ala的突变试验结论与上述推测一致。

糖苷酶水解反应时糖苷键的水解有立体选择性,但合成糖苷键时,合成的键型是多样的,可能是 β 键或 α 键,也可能是1-3、1-4或1-6等^[17]。耐热突变酶TnglyE338A在65℃温度下可催化底物CMP-3-F-Neu5AC和甘露糖的合成,合成产物不能用相应的糖苷酶Tngly和 α -2-(3,6)-NANase II水解,表明产物的糖苷键键型可能发生了改变。这样产生的混合键型连接的寡糖(mixed-linkage)有可能作为寡糖类似物用于糖苷水解酶的抑制剂^[18]。

蛋白质的耐热因素,包括离子键作用、氢键作用、疏水作用、金属键、二硫键、包装效应、Proline理论、 α -螺旋的稳定作用和氨基酸组成等都经过深入广泛的分析^[19,20,21],从大量的研究中发现,一个蛋白质的耐热机制可能是多种因素的结果。

Proline 与其他的 α -氨基酸不同,由于其N原子位于吡咯环上,使得前一个氨基酸与它形成肽键时(C^o-N)不能自由旋转,另外吡咯环还具有疏水作用。Proline分子的这些特点,在形成肽链时导致它比其它氨基酸的构型熵小^[22,23,24],从而降低蛋白质的折叠熵。蛋白质的折叠熵降低可以提高其稳定性^[25,26]。较早,从统计的结果表明蛋白质中脯氨酸含量增多,可以明显提高蛋白质的热稳定性^[27],但脯氨酸在蛋白质二级结构中的位置不同对稳定性的贡献不一样,动力学模拟试验证明脯氨酸位于 α -helix的N端第一位最有利于蛋白质的稳定性^[28]。统计结果也表明脯氨酸偏向位于 α -helix的N端第一位和 β -turn的第二位^[29],这可能有利于蛋白质的稳定。在 β -糖苷酶Tngly 436个氨基酸残基当中,有35脯氨酸残基,其中有5个位于 α -helix N端第一位,其它位于 β -turn的第二位和Loop区。从以上理论可推测位于 α -helix N端第一位的脯氨酸可能对 β -糖苷酶Tngly的稳定性有较大的贡献。我们分别把位于第六个 α -helix和第七个 α -helix N端第一位的P316和P356置换为Gly和Ala,还对两者进行了双突变试验,结果突变酶TnglyP316G、TnglyP356A和双突变TnglyP316G/P356A酶的热稳定性参数 T_m 值下降3℃到7℃;而对位于loop区的脯氨酸突变,热稳定性和野生酶基本相同。这从试验的角度证明了脯氨酸在不同的位置对蛋白质的稳定性贡献不同。这个结论也和野生酶的晶体热因子B值(crystallographic thermal factor B values)相一致,P356、P316和

P344的B值分别为25.27、28.51和29.97。B值和原子的稳定性有关,B值越小原子群的稳定性越大。

β -糖苷酶Tngly热稳定性可能不只是含有脯氨酸的结果,在蛋白质一级序列当中含有9.6%的精氨酸,在3D结构当中发现精氨酸大部分位于蛋白质外周,在 α -helix之间形成离子键网络。这样的离子键在其他耐热蛋白质中都被证明为重要的稳定因子^[30,31,32,33]。较早Perutz等人比较了同一种酶不同来源的耐热酶和常温酶的结构发现,耐热酶的分子表面离子键比常温酶的多^[30]。在以后的耐热酶研究中也发现类似的情况,比如,苹果酸脱氢酶^[34]、甘油醛-3-磷酸-脱氢酶^[35]和DNA聚合酶^[36]等。我们把6- α -helix的Arg325和5- α -helix的Asp235之间形成的离子键打断,突变酶R325L的热稳定性参数 T_m 值下降大约5℃,表明蛋白质外周的离子键对野生酶Tngly热稳定性也有贡献。

各个突变酶与野生酶纯化方法相同,从SDS-PAGE电泳结果分析各个突变酶与野生酶纯度相当,然而突变酶TnglyP316G、TnglyP356A、TnglyP316G/P356A和TnglyR325L的比活与野生酶相比有所上升,可能的原因是在85℃时突变酶结构与野生酶相比“刚性”下降“柔韧性”增加,有利于突变酶催化反应。突变酶TnglyP316G、TnglyP356A、TnglyP316G/P356A、TnglyP344F和TnglyR325L动力学常数与野生酶基本相同,说明被置换的氨基酸残基与酶的活性无关,置换上来的氨基酸残基也不影响酶活性中心结构的正确折叠。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Ichikawa Y, Look GC, Wong CH. Enzyme-catalyzed oligosaccharide synthesis. *Anal Biochem*, 1992, **202**: 215 - 238
- [2] He XY, Zhang SZ, Yang SJ. Cloning and expression of a thermostable β -glycosidase Gene from thermus nonproteolyticus HG 102 and haracterization of the recombinant enzyme. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2002, **94**(3): 243 - 255
- [3] Wang XQ, He XY, Yang SJ *et al.* Structural basis for thermostability of beta-glycosidase from the thermophilic enbacterium thermos nonproteolyticus HG102. *Journal of Bacteriology*, 2003, **185**(14): 4248 - 4255
- [4] Höcker B, Jürgens C, Wilmanns M *et al.* Stability, catalytic versatility and evolution of the ($\beta\alpha$) 8-barrel fold. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, **12**: 376 - 381
- [5] Watt GM, Lowden PAS, Flitsch SL. Enzyme-catalyzed formation of glycosidic linkages. *Curr Opin Struct Biol*, 1997, **7**: 652 - 660
- [6] Elling L. Glycobiotechnology: enzymes for the synthesis of nucleotide sugars. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 1997, **58**: 89 - 144

- [7] Mackenzie LF, Wang Q, Warren RAJ *et al.* Glycosynthases-mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis. *J Am Chem Soc*, 1998, **120**: 5583 - 5584
- [8] Schwede T, Kopp J, Guex N *et al.* SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, 2003, **31**: 3381 - 3385
- [9] Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 1997, **18**: 2714 - 2723
- [10] Peitsch MC. Protein modeling by E-mail. *Bio/Technology*, 1995, **13**: 658 - 660
- [11] Venkatachalam KV, Huang W, LaRocco M *et al.* Characterization of TEM-1 beta-lactamase mutants from positions 238 to 241 with increased catalytic efficiency for ceftazidime. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 23444 - 23450
- [12] Crout DHG, Vic G. Glycosidases and glycosyl transferases in glycoside and oligosaccharide synthesis. *Curr Opin Chem Biol*, 1998, **2**: 98 - 111
- [13] Burnmeister WP, Cottaz S, Driguez H *et al.* The crystal structure of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. *Structure*, 1997, **5**(5): 663 - 675
- [14] Wither SG. Mechanism of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydrate Polymers*, 2001, **44**: 325 - 337
- [15] Wang Q, Trimbur D, Graham R *et al.* Identification of the acid/base catalyst in *Agrobacterium faecalis* beta-glucosidase by kinetic analysis of mutants. *Biochemistry*, 1995, **34**: 14554 - 14562
- [16] Moracci M, Capalbo L, Ciaramella M *et al.* Identification of two glutamic acid residues essential for catalysis in the β -glycosidase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Protein Engineering*, 1996, **9**(12): 1191 - 1195
- [17] Wymer N, Toone EJ. Enzyme-catalyzed synthesis of carbohydrates. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2000, **4**: 110 - 119
- [18] Fort S, Varrot A, Schulein M *et al.* Mixed-linkage cellooligosaccharides: A new class of glycoside hydrolase inhibitors. *ChemBiochem*, 2001, **2**: 319 - 325
- [19] Szilagyi A, Zavodszky P. Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey. *Structure Fold Des*, 2000, **8**: 493 - 504
- [20] Vieille C, Zeikus JG. Thermozymes: identifying molecular determinants of protein structural and functional stability. *TIBTECH*, 1996, **14**: 183 - 190
- [21] Vieille C, Zeikus JG. Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, **65**: 1 - 43
- [22] MacArthur MW, Thornton JM. Influence of proline residues on protein conformation. *J Mol Biol*, 1991, **218**(2): 397 - 412
- [23] Hutchinson EG, Thornton JM. A revised set of potentials for beta-turn formation in proteins. *Protein Sci*, 1994, **3**: 2207 - 2216
- [24] Sriprapundh D, Vieille C, Zeikus JG. Molecular determinants of xylose isomerase thermal stability and activity: analysis by site-directed mutagenesis. *Protein Eng*, 2000, **13**: 259 - 265
- [25] Matthews BW, Nicholson H, Becktel WJ. Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfold. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**: 6663 - 6667
- [26] Hardy F, Vriend G, Veltman OR *et al.* Stabilization of *Bacillus stearothermophilus* neutral protease by introduction of pralines. *FEBS Lett*, 1993, **317**: 89 - 92
- [27] Watanabe K, Masuda T, Ohashi H *et al.* Multiple proline substitution cumulatively thermostabilize *Bacillus cereus* ATCC7064 oligo-1, 6-glucosidase. Irrefragable proof supporting the proline rule. *Eur J Biochem*, 1994, **226**(2): 277 - 283
- [28] Yun RH, Anderson A, Hermans J. Proline in alpha-helix: stability and conformation studied by dynamics simulation. *Proteins*, 1991, **10**: 219 - 228
- [29] Heatwole LC, Soelaiman J, Shobam M. Crystal structure of a thermophilic alcohol dehydrogenase substrate complex suggests determinants of substrate specificity and thermostability. *Protein Struct Funct Genet*, 1999, **37**: 619 - 627
- [30] Perutz MF, Raidt H. Stereochemical basis of heat stability in bacterial ferredoxins and in haemoglobin A2. *Nature*, 1976, **255**: 256 - 259
- [31] Pappenberger G, Schurig H, Jaenicke R. Disruption of an ionic network leads to accelerated thermal denaturation of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *J Mol Biol*, 1997, **274**: 676 - 683
- [32] Merz A, Knochel T, Jansonius JN *et al.* The hyperthermostable in-doleglycerol phosphate synthase from *thermotoga maritime* is destabilized by mutational disruption of two solvent-exposed salt bridges. *J Mol Biol*, 1999, **288**: 753 - 763
- [33] Takano K, Tsuchimori K, Yamagata Y *et al.* Contribution of salt bridges near the surface of a protein to the conformational stability. *Biochemistry*, 2000, **39**: 12375 - 12381
- [34] Kelly CA, Nishiyama M, Ohnishi Y *et al.* Determinants of protein stability in the 1.9-Å crystal structure of malate dehydrogenase from the thermophilic bacterium *Thermus flavus*. *Biochemistry*, 1993, **32**: 3913 - 3922
- [35] Kornröder I, Steipe B, Huber R *et al.* The crystal structure of homo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* at 2.5 Å resolution. *J Mol Biol*, 1995, **246**: 511 - 521
- [36] Korolev S, Nayal M, Barnes WM *et al.* Crystal structure of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I at 2.5 Å resolution: structural basis for thermostability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 9264 - 9268