

• 工业生物技术 •

荚膜红细菌尿卟啉原III转甲基酶的纯化及其酶学性质

康洁^{1,2}, 房欢², 董会娜², 宋文军¹, 张大伟²

1 天津商业大学 生物技术与食品科学学院, 天津 300134

2 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

康洁, 房欢, 董会娜, 等. 荚膜红细菌尿卟啉原III转甲基酶的纯化及其酶学性质. 生物工程学报, 2017, 33(1): 55-67.

Kang J, Fang H, Dong HN, et al. Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine:uroporphyrinogen III methyltransferase from *Rhodobacter capsulatus* SB1003. Chin J Biotech, 2017, 33(1): 55-67.

摘 要: S-腺苷-L-甲硫氨酸依赖型尿卟啉原III转甲基酶 (S-adenosyl-L-methionine uroporphyrinogen III methyltransferase, SUMT) 催化尿卟啉原III (Uroporphyrinogen III, urogen III) 的中心碳原子 C-2 和 C-7 位上甲基化生成前咕啉-2, 是维生素 B₁₂ 生物合成途径中的一步关键酶, 但大部分 SUMT 受其底物 urogen III 和副产物 S-腺苷同型半胱氨酸 (S-adenosyl-L-homocysteine, SAH) 的抑制作用。为了挖掘能耐受高浓度 urogen III 的转甲基酶, 文中从荚膜红细菌 *Rhodobacter capsulatus* SB1003 中克隆 2 个 SUMT 基因 (RCcobA1, RCcobA2), 经表达与纯化后, 检测发现 RCcobA1 和 RCcobA2 的酶活分别为 27.3 U/mg 和 68.9 U/mg, 后者比 VB₁₂ 工业生产菌株脱氮假单胞菌 *Pseudomonas denitrificans* 中内源的 SUMT (PDcobA, 27.9 U/mg) 高 2.4 倍, 并且当 urogen III 浓度高达 70 μmol/L 时都几乎不受抑制作用。因此, RCcobA2 的发现可以为解除 VB₁₂ 合成途径的瓶颈以及提高 VB₁₂ 产量提供理论支持和方向指导。

关键词: 维生素 B₁₂, 尿卟啉原III转甲基酶, 尿卟啉原III, 酶偶联法, 荚膜红细菌

Received: June 29, 2016; **Accepted:** September 5, 2016

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 21506244, 31370089), Natural Science Foundation of Tianjin (Nos. 14ZCZDSY00065, 15JCQNJC09500, 16JCYBJC23500)

Corresponding authors: Wenjun Song. Tel: +86-22-26669611; E-mail: songwenjun@tjcu.edu.cn

Dawei Zhang. Tel: +86-22-84861945; E-mail: zhang_dw@tib.cas.cn

国家自然科学基金 (Nos. 21506244, 31370089), 天津市自然科学基金 (Nos. 14ZCZDSY00065, 15JCQNJC09500, 16JCYBJC23500)资助。

网络出版时间: 2016-09-29

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20160929.1051.003.html>

Purification and characterization of *S*-adenosyl-L-methionine:uroporphyrinogen III methyltransferase from *Rhodobacter capsulatus* SB1003

Jie Kang^{1,2}, Huan Fang², Huina Dong², Wenjun Song¹, and Dawei Zhang²

¹ College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China

² Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: Biosynthesis of vitamin B₁₂ (VB₁₂) requires the methylation at positions C-2 and C-7 of the precursor uroporphyrinogen III (urogen III) to precorrin-2 by *S*-adenosyl-L-methionine uroporphyrinogen III methyltransferase (SUMT), which is a potential bottleneck step. Most of SUMTs are inhibited by urogen III and by-product *S*-adenosyl-L-homocysteine (SAH). In order to mine an SUMT that lacks such an inhibitory property to drive greater flux through the VB₁₂ biosynthetic pathway, we cloned two SUMT genes (RCcobA1, RCcobA2) from *Rhodobacter capsulatus* SB1003 and expressed them in *Escherichia coli* BL21 (DE3). Thereafter, the two enzymes were purified and their specific activity of 27.3 U/mg, 68.9 U/mg were determined respectively. The latter was 2.4 times higher than PDCobA (27.9 U/mg) from *Pseudomonas denitrificans*. Additionally, RCcobA2 could tolerate over 70 μ mol/L urogen III, which has never been reported before. Hence, RCcobA2 can be used as an efficient enzyme to regulate the VB₁₂ metabolic pathway and enhance VB₁₂ production in industrial strains.

Keywords: vitamin B₁₂, uroporphyrinogen III methyltransferase, uroporphyrinogen III, tandem-enzyme reaction, *Rhodobacter capsulatus*

在维生素 B₁₂ (VB₁₂)生物合成途径中, 8 分子 5-氨基乙酰丙酸 (5-aminolevulinic acid, ALA) 在氨基乙酰丙酸脱氢酶 (HemB)、胆色素原脱氢酶 (HemC)、尿卟啉原III合成酶 (HemD)的逐级催化作用下, 经缩合、脱氨、聚合、环化等反应, 最终合成 urogen III^[1]。Urogen III的合成不仅标志着 VB₁₂ 中心环碳骨架初步形成, 而且也是合成其他天然四吡咯环类化合物, 如血红素、叶绿素等分支的前体^[2] (图 1)。因此, SUMT 催化 2 分子 *S*-腺苷-L-甲硫氨酸 (SAM)的甲基转移到 urogen III生成前咕啉-2 是将 urogen III引入 VB₁₂ 合成途径的第一步关键酶。根据功能和大小不同, 将参与不同合成途径中的 SUMT 分为

3 类, 具体信息如表 1 所示。

目前为止, 来自几个不同物种的 SUMT, 如沙门氏菌 *Salmonella enterica* 的 CysG^[13]、脱氮假单胞菌 *Pseudomonas denitrificans* 的 PDCobA^[14]、嗜热栖热菌 *Thermus thermophilus* 的 ttSUMT^[15]、铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 的 NirE^[16] 等, 都经过酶学性质的初步探究和晶体结构解析, 得出了较为一致的结论: 大部分 SUMT 都受自身底物 urogen III和副产物 SAH 的抑制作用, 但却不受前咕啉-2 和代谢途径终产物 VB₁₂ 的反馈抑制。这种特殊的酶学性质可能是合成 VB₁₂ 代谢途径中一种重要的调控方式, 也可能是导致 VB₁₂ 微生物发酵产量无法突破的原因之一。法国的 RPR

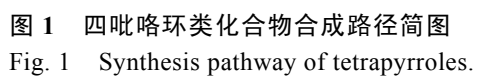


表 1 SUMT 的分类及特点

Table 1 Classification and features of SUMTs

Category	Characteristic	Protein	Metabolic pathway	Source
The first	Only SUMT activity; dimeric protein of 30 kDa subunits	CobA	Vitamin B ₁₂	<i>Methanobacterium ivanovii</i> ^[3]
				<i>Pseudomonas denitrificans</i> ^[4]
		SirA	Siroheme	<i>Bacillus megatherium</i> ^[5]
		Met1P		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ^[6]
		UPM1		<i>Arabidopsis thaliana</i> ^[7]
The second	SUMT and HemD activity; dimeric protein of 50 kDa subunits	NirE	Hemd ₁	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^[8]
		CobA/HemD	Tetrapyrrols	<i>Lactobacillus reuteri</i> ^[9]
				<i>Desulfovibrio vulgaris</i> ^[10]
				<i>Selenomonas rum inantium</i> ^[11]
The third	SUMT, dehydrogenase and ferrochelatase activity; dimeic protein of 50 kDa subunits	CysG	Tetrapyrrols	<i>Escherichia coli</i> ^[12]
				<i>Salmonella enterica</i> ^[13]

公司曾经提高了 *P. denitrificans* 中 *cobA* 基因的拷贝数,发现对提高 VB₁₂ 产量有所帮助^[17],为了进一步克服 urogen III 的抑制作用,RPR 公司建议在 *P. denitrificans* 中异源表达来自产甲烷菌 *Methanobacterium ivanovii* 的 SUMT 编码基因^[18]。Piao 等^[19]在费氏丙酸菌 *Propionibacterium freudenreichii* 中过表达内源的 *cobA* 基因,使 VB₁₂ 产量比空载菌株提高 1.7 倍。目前,国内外还没有报道能够完全解除底物 urogen III 和 SAH 抑制作用的 SUMT。

荚膜红细菌 *Rhodobacter capsulatus* 是紫色非硫光合细菌,具有在有氧或无氧、黑暗或光照等环境下生存的能力,能够合成多种吡咯环类化合物适应不同条件下的代谢需求^[20]。但在无氧和有氧条件下,都需要合成 VB₁₂ 辅助完成 DNA 修复、甲硫氨酸合成等生理功能,并且,*R. capsulatus* 具有缩减其他分支途径,使代谢流直接流向特定路径的复杂而周密的调控机制^[21]。

因此,推测来源于 *R. capsulatus* 的 SUMT 可能在 VB₁₂ 合成代谢流中有相对优势。此外,Deery 等^[22]报道在大肠杆菌中表达含有 *R. capsulatus* 中的 SUMT 编码基因的操纵子,合成了 VB₁₂ 途径的中间代谢物氢咕啉酸,推测可能是 *R. capsulatus* 的 SUMT 催化更多 urogen III 进入 VB₁₂ 代谢流,缓解了合成途径的瓶颈。为了研究 *R. capsulatus* 的 SUMT 是否确实具有合成 VB₁₂ 的优势,本文进行了 *R. capsulatus* SB1003 中 SUMT 的纯化和酶学性质研究。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒与设计的引物

文中所用菌株、质粒列于表 2,引物均列于表 3 中。

1.2 培养基、酶及主要试剂

LB 培养基 (1 L):氯化钠 10 g,胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g。

表 2 菌株与质粒

Table 2 Strains and plasmids

Strains or plasmids	Function	Properties	Source
<i>E. coli</i> DH5 α	Clone and plasmid propagation	F ⁻ ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA</i> - <i>argF</i>) U169 <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (<i>rk</i> ⁻ <i>mk</i> ⁺) <i>phoA</i> supE44 λ ⁻ <i>thi</i> ⁻¹ <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>	This lab
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Protein expression	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻) <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>rne131</i> (DE3)	This lab
<i>R. capsulatus</i> SB1003	PCR template	Wild-type	This lab
<i>P. denitrificans</i>	PCR template	Wild-type	This lab
<i>Bacillus megatherium</i>	PCR template	Wild-type	This lab
pET-28a (+)	Control vector	T7-promoter Kanr His-Tag coding sequence T7-terminator pBR322 origin	This lab
pET28a-PDcobA	Expression of PDcobA	As above	This work
pET28a-RCcobA1	Expression of RCcobA1	As above	This work
pET28a-RCcobA2	Expression of RCcobA2	As above	This work
pET28a-hemB	Expression of HemB	As above	This work
pET28a-hemC	Expression of HemC	As above	This work
pET28a-hemD	Expression of HemD	As above	This work
pET28a-SirC	Expression of SirC	As above	This work

表 3 文中所用引物

Table 3 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Restriction enzyme site
RCcobA1-F	CTAGCTAGCATGACCCAGATCCTTCGC	<i>Nhe</i> I
RCcobA1-R	CCCAAGCTTTCATATCACGGCCTCGAG	<i>Hind</i> III
RCcobA2-F	GGAATTCCATATGAGCGGTTTCGTTTCT	<i>Nde</i> I
RCcobA2-R	CCGCTCGAGTCAGGCCTCCGGCGCG	<i>Xho</i> I
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
T7-Term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	

The underlined letters indicate recognition site of specific restriction enzyme.

酶：限制性内切酶购于 Thermo Fisher Scientific 公司。DNA 聚合酶 PrimerSTAR Mix 购自 TaKaRa 公司。2 \times Taq PCR MasterMix 购于北京天根生化科技有限公司。

主要试剂：基因组 DNA 提取试剂盒 (DP302-02)，质粒小提试剂盒 (D6943-02)，胶回收试剂盒和柱式 PCR 产物纯化试剂盒

(D6492-02) 购于 OMEGA。引物合成和测序都在金唯智公司。Millipore 超滤管购于上海俊晟公司。Ni-NTA 填料购于 GE Healthcare。其他未特殊注明的试剂均购于 Sigma 公司。平衡缓冲液：20 mmol/L 磷酸二氢钠，0.5 mol/L 氯化钠，30 mmol/L 咪唑，pH 7.4；洗涤缓冲液：20 mmol/L 磷酸二氢钠，0.5 mol/L 氯化钠，100 mmol/L 咪唑，pH 7.4；

洗脱缓冲液: 20 mmol/L 磷酸二氢钠, 0.5 mol/L 氯化钠, 500 mmol/L 咪唑, pH 7.4; 蛋白保存缓冲液: 50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L 氯化钠, 20% (V/V) 甘油, pH 7.5。

1.3 主要器材

PTC-1148 型 PCR 仪 美国 BIO-RAD 公司; 连续波长多功能酶标仪 (SpectraMax M5), 美国 MD 公司; 高压细胞破碎仪 (JN-3000 Plus), 天津上善科技公司; 真空离心浓缩仪 (PTSB2012-059), 天津美瑞泰克公司; 厌氧培养箱 (Sci-tive N), 北京隆福佳公司。

1.4 方法

1.4.1 基因克隆与构建表达菌株

从 *P. denitrifican* 和 SB1003 菌株中提取基因组总 DNA, 并以此为模板, 用 Primer premier 5.0 软件设计引物, PCR 扩增 3 个编码 SUMT 基因片段, 并和表达载体 pET-28a(+) 分别用相应的限制性内切酶切割、连接, 转化入感受态 *E. coli* DH5 α , 转化液涂布于含卡那霉素 50 μ g/mL 的 LB 平板上培养, T7 载体常用引物进行菌落 PCR 验证, 送阳性克隆到公司测序。重组质粒 pET28a-PDcobA、pET28a-RCcobA1 和 pET28a-RCcobA2 分别导入表达菌株 BL21(DE3), 冻存菌液。基因 *hemB*、*hemC*、*hemD* 和 *sirC* 的克隆和表达载体的构建按照文献[21]操作。

1.4.2 蛋白的表达与纯化

将上述表达菌株接种于 LB 培养基中, 培养至 OD_{600} 至 0.6–0.8, 加入终浓度为 0.4 mmol/L IPTG 诱导蛋白表达, 16 $^{\circ}$ C 培养过夜。

以下所有操作都在 4 $^{\circ}$ C 或冰上进行。离心 (5 000 r/min、20 min) 收集菌体, 用平衡缓冲液重悬, 高压破碎后, 11 000 r/min 离心 1 h, 0.22 μ m

滤膜过滤, 过镍柱; 接着用洗涤缓冲液冲洗 3 次, 每次洗 10 倍的柱体积; 最后用 3–5 倍柱体积的洗脱缓冲液将结合到填料上的目的蛋白洗脱下来, 并借助超滤管将目的蛋白中的缓冲液更换成蛋白保存缓冲液, 最后储存在–20 $^{\circ}$ C。

制备蛋白样, 通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法判断蛋白的表达与纯化。按照 BCA 试剂盒对蛋白定量。

1.4.3 酶偶联法

为了验证酶偶联法实验能否重现, 按照文献[23]方法进行操作。反应体系如下: 5 mmol/L ALA, 200 μ mol/L SAM, 1 mmol/L 1-萘乙酰胺 (NAD^{+}), 5 \times 缓冲液 (脱气), 0.32 μ mol/L HemB, 2.27 μ mol/L HemC, 2.12 μ mol/L HemD, 10.69 μ mol/L SUMT, 1 μ mol/L SirC, 水补齐至总体积为 100 μ L。以不加 SUMT 的反应液为对照, 分别添加 PDcobA、RCcobA1 和 RCcobA2 的反应液为实验组, 在黑色 96 孔板中, 37 $^{\circ}$ C 温育 20 min, 用酶标仪进行光谱扫描 (200–700 nm)。

1.4.4 酶活测定

酶促反应体系按照 1.4.3。待反应液温育 10 min 后, 快速加入 ALA, 振荡混匀, 用动力学方法检测 3–20 min 之间吸光度值随时间的变化。根据文献[16]报道 Sirohydrochlorin (SHC) 的摩尔吸光系数 (ϵ 376 nm) 为 2.4×10^5 mol/(L \cdot cm), 计算酶促反应初速度, 折算出酶活, 酶活单位 (U) 定义为在最适条件下, 1 h 内催化 1 nmol ALA 转化成前咕啉-2 所需要的酶量 (mg)。

1.4.5 urogen III 的制备

由于没有商品化的 urogen III, 参照文献[24]报道的方法 (方法略有改动), 进行 urogen III 制备实验。在厌氧箱中, 利用裹有锡箔纸的厌

氧玻璃瓶为反应容器,加入 5×缓冲液(脱气), 5 mmol/L ALA, 0.32 μmol/L HemB, 2.27 μmol/L HemC, 2.12 μmol/L HemD, 水补齐至总体积为 20 mL, 37 °C 反应 2 h, 随后将反应液 80 °C 热处理 15 min, 使酶失活。0.22 μm 滤膜过滤, 将滤液在真空条件下离心浓缩后, 无氧冻存。取 10 μL 的制备样, 加 90 μL 1 mol/L HCl 暴露光下 1 h, 用酶标仪扫描 405 nm 处的吸光度值并计算 urogen III 的浓度 ($\epsilon_{405\text{ nm}}=5.4\times 10^5\text{ mol}/(\text{L}\cdot\text{cm})$)。

1.4.6 urogen III 和 SAH 对酶活的抑制

反应体系为: 5×缓冲液(脱气), 200 mmol/L SAM, 100 μmol/L NAD⁺, 1 mmol/L SirC, 2 μmol/L SUMT, 按照方法 1.4.4 分别检测不同浓度 urogen III (0–70 μmol/L) 和 SAH (0–60 μmol/L) 条件

下对应的初速度, 利用双倒数法测定米氏方程中的参数 K_m 和 K_{cat} 。

2 结果与分析

2.1 核苷酸序列比对分析

用 Clustal Omega 软件对克隆获得的基因 PDcobA、RCcobA1 和 RCcobA2 与数据库中已登录的来自不同物种的编码 SUMT 基因进行核苷酸序列比对分析。结果如表 4 所示, 不同种属来源的基因, 其序列的同源性介于 40%–65% 之间, 亲缘关系较近的不同属之间的序列同源性在 80% 左右, 同属的不同菌种, SUMT 的同源性均在 90% 以上, 说明 SUMT 的核苷酸序列相对较保守, 酶学特性的差异受蛋白高级结构的影响。

表 4 SUMT 的核苷酸序列比较

Table 4 Nucleotide sequence alignment of SUMTs

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>cysG</i> _EC	1	***												
<i>cysG</i> _SE	2	80.9	***											
<i>cobA</i> _PD	3	52.8	54.6	***										
<i>cysG</i> _PF	4	53.7	52.6	56.4	***									
<i>cobA2</i> _RC	5	50.8	50.4	53.8	59.6	***								
<i>sumt</i> _TT	6	49.7	50.8	53.0	54.0	51.0	***							
<i>cobA-hemO</i> _LR	7	47.2	49.0	46.5	45.4	43.3	46.4	***						
<i>sumt</i> _GS	8	54.8	55.8	56.1	53.4	52.5	51.6	52.4	***					
<i>nirE</i> _PA01	9	57.9	59.2	59.2	61.1	54.6	60.0	48.4	57.7	***				
<i>nirE</i> _PAM18	10	57.8	59.3	59.2	60.9	54.4	60.0	48.5	57.7	99.9	***			
<i>cobA</i> _PA01	11	56.8	56.2	59.1	58.3	55.2	55.8	47.4	58.1	62.8	62.7	***		
<i>cysG</i> _PA01	12	56.7	55.8	59.0	58.2	55.0	55.6	47.5	57.7	62.9	62.8	99.6	***	
<i>cobA1</i> _RC	13	51.6	52.1	55.5	53.6	54.6	52.1	44.4	51.3	57.7	57.8	61.2	61.1	***

EC: *E. coli*; SE: *S. enterica*; PD: *P. denitrificans*; PF: *P. freudenreichii*; RC: *R. capsulatus*; TT: *T. thermophiles*; LR: *Lactobacillus reuteri*; GS: *Geobacillus stearothermophilus*; PA: *P. aeruginosa*.

2.2 高级结构比对分析

为了分析 3 个 SUMT 的结构与功能的关系, 用 ESPript 3.0 (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript/index.php>) 软件, 以 PDcobA 作为预测模板, 将 RCcobA1, RCcobA2 和 NirE 进行二级结构比对 (图 2A)。发现氨基酸序列的同源性都接近 50%, 亚基的主要构成组分都是由 10 个 β -折叠片层和 9 个 α -螺旋交替排列的, 其中 C 端的 β_8 和 β_9 之间是用 β -转角连接, 模体中还存在 2 个 3_{10} -螺旋 (η) 及 0.08% 无规则卷曲 (特指 loop)。RCcobA1 和 RCcobA2 与 SUMT 序列上高度保守区域的存在初步说明了它们具有相似的转甲基功能。

经过与 PDB 编号为 2YBO、1S4D、1VA0、1VE2 的蛋白比对后, 用 Discovery Studio 4.1 的 MODELLER 方法同源建模, 进行重叠比较, 结果如图 2B 所示。4 个 SUMT 的结构折叠方式非常相似, 形成“螃蟹”的构型, 分析发现, 其 N 端 (β_3 - α_2 结构域) 和 C 端 (β_6 - α_5 结构域) 分别存在 1 个氨基酸序列非保守的 loop, 组成 2 个“螯”形, 与一些内部的氨基酸残基共同构成底物 urogen III 的结合口袋, 并且 loop 折叠方式和长度存在不同。Storbeck 等^[24]研究发现, NirE 的 loop 区氨基酸残基可能参与底物羧基化反应或对咕啉环的质子重排发挥重要作用。因此, 4 个 SUMT 的 loop 区不同, 形成的底物结合口袋也不同, 可能会对酶本身的催化机制和对底物 urogen III 耐受性造成差异。

2.3 SUMT 表达与纯化

文献[25-26]报道, 当 SUMT 在大肠杆菌中表达时, 催化产物在紫外灯照射下可以发出粉红色荧光。为了初步判断 3 个基因是否在 BL21

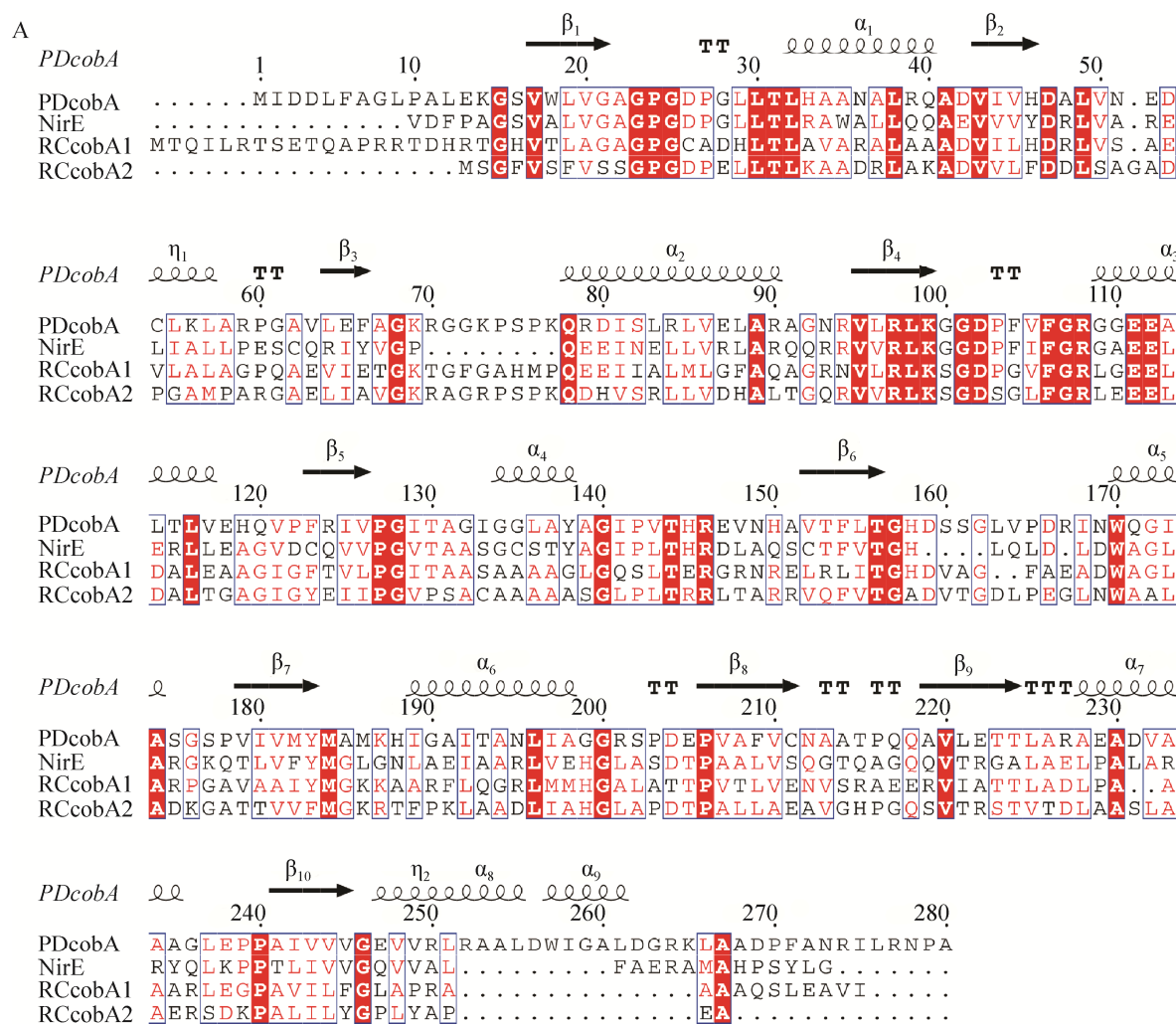
中正常表达, 以 BL21/pET28a 菌株活化后的平板为对照, 观察上述 3 种重组菌的颜色对比, 结果如图 3 所示, BL21/pET28a-PDcobA 和 BL21/pET28a-RCcobA2 两株菌都发出强烈红色荧光, 与预期结果一致, 说明 SUMT 基因在 BL21 中能正常表达且具有酶活。BL21/pET28a-RCcobA1 有微弱荧光, 推测可能是 RCcobA1 的酶活较低, 积累荧光产物量较少的原因。

随后收集纯化后的蛋白经 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 结果如图 4 所示, PDcobA、RCcobA1 和 RCcobA2 的蛋白分子量大小分别约为 32 kDa、30 kDa 和 29 kDa, 与理论分子量一致。

2.4 酶活及动力学常数测定

房欢等^[23]曾经报道, 利用酶偶联法可以将 SUMT 催化产生的不稳定产物前咕啉-2 转化成在 376 nm 处有特征吸收峰的化合物 SHC。结果如图 5 所示, 不加 SUMT 的多酶反应体系在 400 nm 和 500 nm 处有吸收峰, 应该是 urogen III 的特征吸收峰。而分别添加 3 个 SUMT 的反应液都在 376 nm 处多 1 个新的吸收峰, 与文献报道结果一致。说明此方法可以快速、准确的判断新物质 SHC 的合成, 并且可以用于 SUMT 酶活检测。

在相同检测条件下, RCcobA2 的酶活 (68.9 U/mg) 比 PDcobA 的酶活 (27.9 U/mg) 高 2.4 倍, 但 RCcobA1 的酶活与 PDcobA 基本一致, 动力学常数如表 5。文献[23]报道, 对 CysG 结构的 N 端 loop 中氨基酸 (Lys-72) 定点突变后, 酶活变化很大, 而根据二级结构比对结果, 发现 RCcobA1 在对应位置的氨基酸残基是苯丙氨酸 (F), 而其他 2 个 SUMT 的氨基酸残基为甘氨酸 (G), 虽然都是非极性氨基酸, 但后者形



B

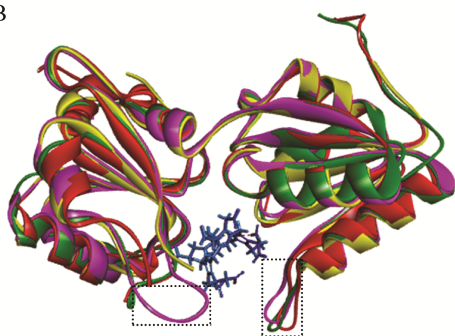


图 2 几个 SUMT 的二级结构比对 (A) 和以 PDcobA 为模板的三级结构模拟图 (B)

Fig. 2 Structure-based amino acid sequence alignment (A) and superposition of tertiary structure models (B) from RCcobA1 and RCcobA2 with NirE and PDcobA. Helices and β -structures as found in PDcobA are indicated. Red boxes highlight identical amino acids among these four SUMTs. The tertiary structural models are shown in ribbon representation: PDcobA (red) and NirE (yellow) and RCcobA1 (green) as well as RCcobA2 (purple). The urogen III molecule is shown as ball and stick model. The beginnings and ends of flexible loops are indicated by gridlines.

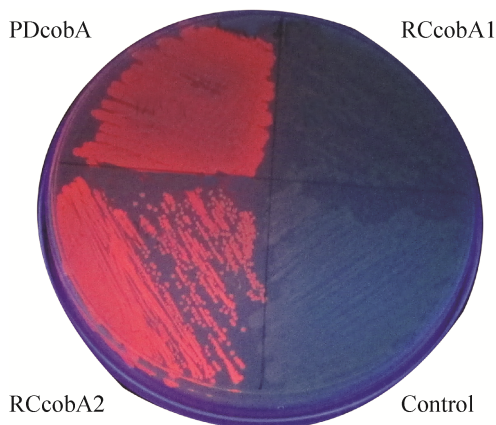


图3 紫外灯照射下3个SUMT基因表达菌株与空载菌株(对照)的荧光对比

Fig. 3 Expression of the SUMTs in *E. coli* cultured in plates illuminated with UV light.

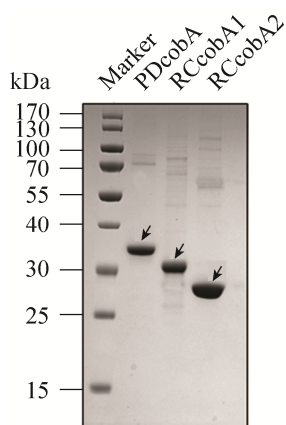


图4 SDS-PAGE分析纯化后的SUMT蛋白

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified proteins from PDcobA, RCcobA1 and RCcobA2.

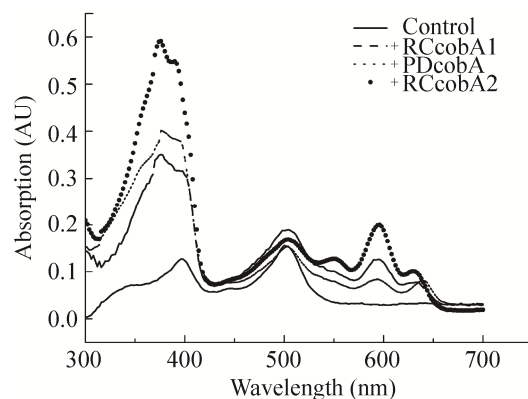


图5 多酶反应体系的全波长扫描图

Fig. 5 UV-visible absorption spectra of products in the tandem-enzyme assay.

成的空间位阻较小,可能利于酶与底物的快速结合,进而酶活相对较高。

2.5 urogen III和SAH对酶活的抑制情况

检测结果如图6所示,RCcobA1和RCcobA2这两个酶对urogen III和SAH耐受程度分别高达70 $\mu\text{mol/L}$ 和5 $\mu\text{mol/L}$,相比其他已报道过的SUMT有一定优势,推测可能是*R. capsulatus*菌株的独有特性。通过三级结构比对发现,RCcobA1和RCcobA2的底物结合口袋与PDcobA和NirE不同,导致底物进出难易程度不同,这可能是不同种类SUMT受urogen III抑制程度不同的原因。

表5 不同SUMT的动力学常数对比

Table 5 Kinetic parameters of SUMTs from various sources

SUMT	Urogen III			Source
	K_{cat} (s^{-1})	K_{m} ($\mu\text{mol/L}$)	$K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{s}^{-1}/(\mu\text{mol/L})$)	
NirE (<i>P. aeruginosa</i>)	1.6×10^{-3}	9.8	1.6×10^{-4}	Reference [8]
CysG (<i>E. coli</i>)	1.9×10^{-3}	39.7	4.8×10^{-5}	Reference [12]
RCcobA1 (<i>R. capsulatus</i>)	1.2×10^{-3}	4.0	3.0×10^{-4}	This work
RCcobA2 (<i>R. capsulatus</i>)	2.8×10^{-3}	10.8	2.7×10^{-4}	This work

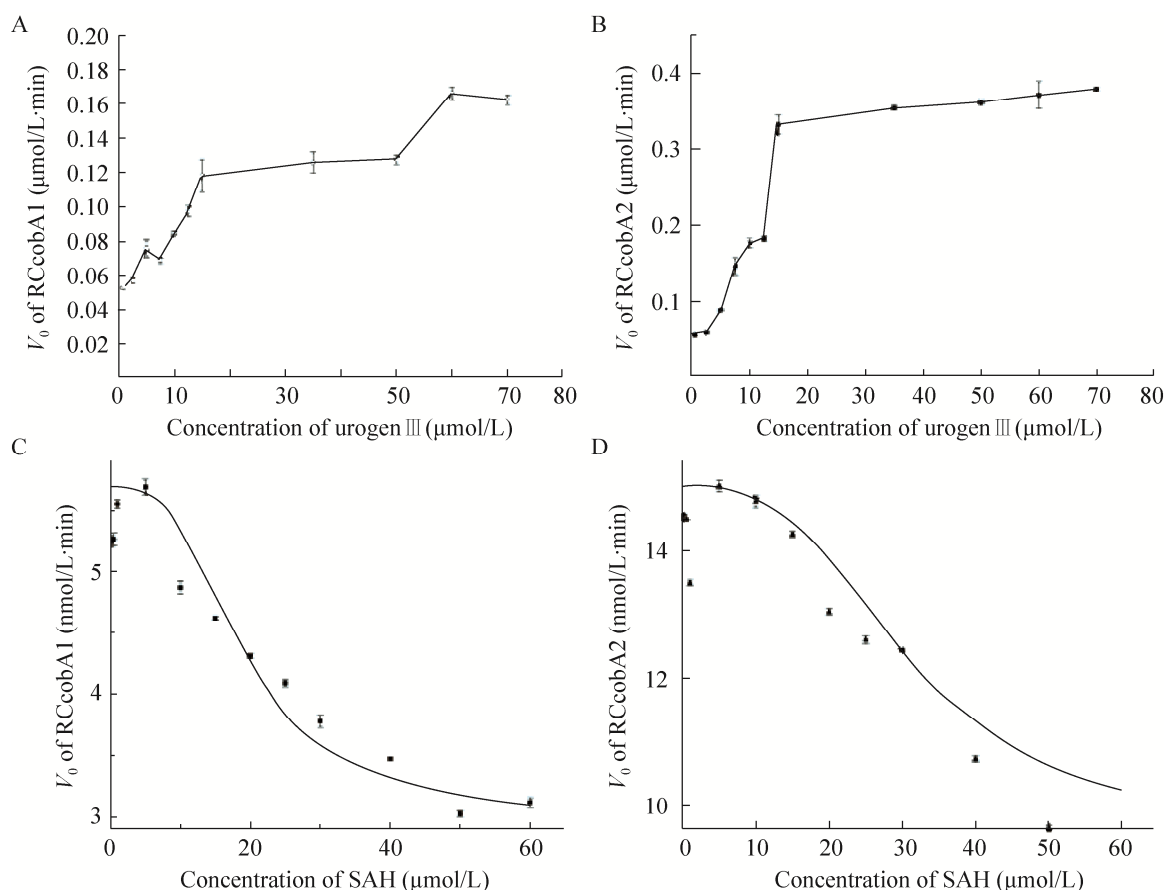


图6 不同浓度的 urogen III 和 SAH 对 RCcobA1 和 RCcobA2 酶活的影响

Fig. 6 Inhibition of RCcobA1 and RCcobA2 activity by urogen III and SAH.

3 结论

随着对 VB_{12} 合成途径的深入研究,前人^[27-28]发现 SUMT 的催化活性受底物 urogen III 的抑制是工业生产 VB_{12} 的瓶颈之一,因此挖掘能够耐受高浓度 urogen III 和 SAH 的 SUMT,调控前体尽可能流向 VB_{12} 途径是提高产量的必由之路。Blanche 等^[4]研究发现 *P. denitrificans* 中的 PDcobA 催化活性很低,并且当 urogen III 浓度达到 2 $\mu\text{mol/L}$ 时就明显受到抑制。Raux 等^[9]后来发现来自于 *B. megaterium* 的 SUMT 对 urogen III 敏感程度已经达到 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 。目前发现能耐受较高

浓度底物的 SUMT 是 NirE (*P. aeruginosa*) 和 CorA (*M. ivanovii*),但是都没有突破 20 $\mu\text{mol/L}$ ^[8-9]。本文对来自 *R. capsulatus* SB1003 中尿卟啉原Ⅲ转甲基酶 RCcobA1 和 RCcobA2 进行表达纯化,高级结构比对,酶活测定以及对底物 urogen III 和副产物 SAH 耐受性的初步研究。结果表明,2 个 SUMT 都能在 BL21(DE3) 中高效可溶性表达且诱导之后在 UV 灯照射下发出红色荧光。与已经报道的 SUMT 进行高级结构比对,发现结构域是由 β -折叠和 α -螺旋交替连接形成的,不同之处在于构成 urogen III 结合口袋的 2 个 loop 区,氨基酸组成的个数、种类和卷曲构型都

极为不同,造成结合口袋的大小和关键的氨基酸残基也不相同,可能导致酶学性质有所差异。酶活检测发现 RCcobA2 比 PDcobA1 高 2.4 倍,并且当 urogen III 浓度高达 70 $\mu\text{mol/L}$ 时其活性仍几乎不受抑制,本发现可以为解除 VB₁₂ 合成途径的瓶颈及提高 VB₁₂ 产量提供理论支持和方向指导,具有重要意义。但是,虽然在体外实验中,RCcobA2 比其他 SUMT 表现出一定优势,还需要将其过表达达到 VB₁₂ 工业生产菌株中,进一步验证 RCcobA2 是否在菌体内能解除 urogen III 和 SAH 抑制作用,提高 VB₁₂ 产量。

REFERENCES

- [1] Kang Z, Zhang JL, Zhou JW, et al. Recent advances in microbial production of δ -aminolevulinic acid and vitamin B₁₂. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(6): 1533–1542.
- [2] Martens JH, Barg H, Warren M, et al. Microbial production of vitamin B₁₂. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58(3): 275–285.
- [3] Vannini V, Rodríguez A, Vera JL, et al. Cloning and heterologous expression of *Lactobacillus reuteri* uroporphyrinogen III synthase/methyltransferase gene (*cobA/hemD*): preliminary characterization. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(8): 1625–1632.
- [4] Blanche F, Debussche L, Thibaut D, et al. Purification and characterization of *S*-adenosyl-L-methionine: uroporphyrinogen III methyltransferase from *Pseudomonas denitrificans*. *J Bacteriol*, 1989, 171(8): 4222–4231.
- [5] Raux E, Leech HK, Beck R, et al. Identification and functional analysis of enzymes required for precorrin-2 dehydrogenation and metal ion insertion in the biosynthesis of sirohaem and cobalamin in *Bacillus megaterium*. *Biochem J*, 2003, 370(2): 505–516.
- [6] Hansen J, Muldbjerg M, Chérest H, et al. Siroheme biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* requires the products of both the *MET1* and *MET8* genes. *FEBS Lett*, 1997, 401(1): 20–24.
- [7] Leustek T, Smith M, Murillo M, et al. Siroheme biosynthesis in higher plants, analysis of an *S*-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III methyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 1997, 272(5): 2744–2752.
- [8] Storbeck S, Walther J, Müller J, et al. The *Pseudomonas aeruginosa nirE* gene encodes the *S*-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III methyltransferase required for heme *d*₁ biosynthesis. *FEBS J*, 2009, 276(20): 5973–5982.
- [9] Blanche F, Robin C, Couder M, et al. Purification, characterization, and molecular cloning of *S*-adenosyl-L-methionine: uroporphyrinogen III methyltransferase from *Methanobacterium ivanovii*. *J Bacteriol*, 1991, 173(15): 4637–4645.
- [10] Lobo SA, Brindley A, Warren MJ, et al. Functional characterization of the early steps of tetrapyrrole biosynthesis and modification in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Biochem J*, 2009, 420(2): 317–326.
- [11] Anderson PJ, Entsch B, McKay DB. A gene, *cobA+hemD*, from *Selenomonas ruminantium* encodes a bifunctional enzyme involved in the synthesis of vitamin B₁₂. *Gene*, 2001, 281(1/2): 63–70.
- [12] Pencer JB, Stolowich NJ, Roessner CA, et al. The *Escherichia coli* *cysG* gene encodes the multifunctional protein, siroheme synthase. *FEBS Lett*, 1993, 335(1): 57–60.
- [13] Stroupe ME, Leech HK, Daniels DS, et al. CysG structure reveals tetrapyrrole-binding features and novel regulation of siroheme biosynthesis. *Nat Struct Biol*, 2003, 10(12): 1064–1073.
- [14] Vévodová J, Graham RM, Raux E, et al. Structure/function studies on a *S*-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III C methyltransferase (SUMT), a key regulatory enzyme of tetrapyrrole biosynthesis. *J Mol Biol*, 2004, 344(2): 419–433.
- [15] Rehse PH, Kitao T, Tahirov TH. Structure of a closed-form uroporphyrinogen-III C-methyltransferase

- from *Thermus thermophilus*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2005, 61(7): 913–919.
- [16] Singh W, Karabancheva-Christova TG, Black GW, et al. Conformational dynamics, ligand binding and effects of mutations in NirE an S-adenosyl-L-methionine dependent methyltransferase. Sci Rep, 2016, 6: 20107.
- [17] Blanche F, Cameron B, Crouzet J, et al. Biosynthesis method enabling the preparation of cobalamins: WO9743421. 1997-11-20.
- [18] Blanche F, Cameron B, Crouzet J, et al. Polypeptides involved in the biosynthesis of cobalamines and/or cobamides, DNA sequences coding for these polypeptides, and their preparation and use: EP0516647. 1998-12-30.
- [19] Piao YZ, Yamashita M, Kawaraichi N, et al. Production of vitamin B₁₂ in genetically engineered *Propionibacterium freudenreichii*. J Biosci Bioeng, 2004, 98(3): 167–173.
- [20] McGoldrick H, Deery E, Warren M, et al. Cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthesis in *Rhodobacter capsulatus*. Biochem Soc Trans, 2002, 30(4): 646–648.
- [21] Yin L, Bauer CE. Controlling the delicate balance of tetrapyrrole biosynthesis. Phil Trans R Soc B, 2013, 368(1622): 20120262.
- [22] Deery E, Schroeder S, Lawrence AD, et al. An enzyme-trap approach allows isolation of intermediates in cobalamin biosynthesis. Nat Chem Biol, 2012, 8(11): 933–940.
- [23] Fang H, Dong HN, Cai T, et al. *In vitro* optimization of enzymes involved in precorrin-2 synthesis using response surface methodology. PLoS ONE, 2016, 11(3): e0151149.
- [24] Storbeck S, Saha S, Krausze J, et al. Crystal structure of the Heme d₁ biosynthesis enzyme NirE in complex with its substrate reveals new insights into the catalytic mechanism of S-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III methyltransferases. J Biol Chem, 2011, 286(30): 26754–26767.
- [25] Wang ZZ, Yan HW, Li S, et al. Coupled selection of protein solubility in *E. coli* using uroporphyrinogen III methyltransferase as red fluorescent reporter. J Biotechnol, 2014, 186: 169–174.
- [26] Wang ZZ, Li S, Li J, et al. Engineering uroporphyrinogen III methyltransferase as a red fluorescent reporter in *E. coli*. Enzyme Microb Technol, 2014, 61–62: 1–6.
- [27] Warren MJ, Raux E, Schubert HL, et al. The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B₁₂). Nat Prod Rep, 2002, 19(4): 390–412.
- [28] Escalante-Semerena JC, Warren MJ. Biosynthesis and use of cobalamin (B₁₂). EcoSal Plus, 2008, 3(1), doi: 10.1128/ecosalplus.3.6.3.8.

(本文责编 陈宏宇)