

# 人分泌型磷脂酶 A2 GIIE 的 E54 突变及其对底物选择性的影响

侯淑琳<sup>1,2</sup>, 白俊平<sup>1</sup>, 陆昕<sup>1</sup>, 张玉龙<sup>2</sup>, 许婷婷<sup>2</sup>, 解军<sup>1</sup>

1 山西医科大学 基础医学院, 出生缺陷与细胞再生山西省重点实验室, 山西 太原 030001

2 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 呼吸疾病国家重点实验室, 广东 广州 510530

侯淑琳, 白俊平, 陆昕, 等. 人分泌型磷脂酶 A2 GIIE 的 E54 突变及其对底物选择性的影响. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2513-2521.

Hou SL, Bai JP, Lu X, et al. Effect of E54 mutation of human secreted phospholipase A2 GIIE on substrate selectivity. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2513-2521.

**摘要:** 人分泌型磷脂酶 A2 GIIE (Human secreted phospholipase A2 GIIE, hGIIE) 通过发挥酶催化作用, 参与炎症反应和脂代谢过程。为了揭示 hGIIE 的底物选择机制, 文中对 hGIIE 进行了定点突变, 采用毕赤酵母 *Pichia pastoris* 重组表达突变体蛋白, 然后通过阳离子交换和分子排阻两步法纯化蛋白, 最后用等温微量热滴定仪测定酶活性。hGIIE 的结构分析显示, 氨基酸 E54 可能与 GIIE 的底物头基选择性有关, 经过同源序列比对, 拟将 E54 突变为丙氨酸 (A)、苯丙氨酸 (F) 和赖氨酸 (K)。突变体 E54A、E54F 和 E54K 在毕赤酵母组成型表达系统中实现重组表达, 通过两步纯化, 纯度达到 90% 以上。酶活性实验显示, 突变体与底物 1,2-二己酰卵磷脂 (1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DHPC) 和 1,2-二己酰磷酸甘油 (1,2-dihexyl phosphate glycerol, DHPG) 的亲合力发生改变, 其中突变体 E54K 与 DHPG 的  $K_m$  值为突变前的 0.39 倍, 亲和力明显增强; 突变体 E54F 与 DHPC 的  $K_m$  值为突变前的 1.93 倍, 亲和力明显减弱。hGIIE 的 E54 突变体蛋白与磷脂底物的亲和力发生明显改变, 说明 E54 在 hGIIE 的磷脂底物选择性水解过程中起重要作用。

**关键词:** 分泌型磷脂酶 A2, GIIE, 异源表达, 突变, 底物选择性

**Received:** September 9, 2020; **Accepted:** October 21, 2020

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31900917), Science Research Start-up Fund for Doctor of Shanxi Province of China (No. SD1812), Science Research Start-up Fund for Doctor of Shanxi Medical University, China (No. XD1812), Science and Technology Innovation Plan of Colleges and Universities of Education Department of Shanxi Province, China (No. 2019L0423), Science and Technology Planning Project of Guangdong Province, China (No. 2015A030312017).

**Corresponding author:** Jun Xie. Tel: +86-351-3985008; E-mail: junxie@sxmu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31900917), 山西省博士科研启动基金 (No. SD1812), 山西医科大学博士科研启动基金 (No. XD1812), 山西省教育厅高校科技创新计划 (No. 2019L0423), 广东省科技计划项目 (No. 2015A030312017) 资助。

网络出版时间: 2020-11-26

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20201126.1442.002.html>

# Effect of E54 mutation of human secreted phospholipase A2 GIIE on substrate selectivity

Shulin Hou<sup>1,2</sup>, Junping Bai<sup>1</sup>, Xin Lu<sup>1</sup>, Yulong Zhang<sup>2</sup>, Tingting Xu<sup>2</sup>, and Jun Xie<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Shanxi Key Laboratory of Birth Defect and Cell Regeneration, College of Basic Medical Sciences, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China

<sup>2</sup> State Key Laboratory of Respiratory Disease, Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, Guangdong, China

**Abstract:** Human secreted phospholipase A2 GIIE (hGIIE) is involved in inflammation and lipid metabolism due to its ability of hydrolyzing phospholipids. To reveal the mechanism of substrate head-group selectivity, we analyzed the effect of mutation of hGIIE on its activity and selectivity. hGIIE structural analysis showed that E54 might be related to its substrate head-group selectivity. According to the sequence alignment, E54 was mutated to alanine, phenylalanine, and lysine. Mutated genes were cloned and expressed in *Pichia pastoris* X33, and the enzymes with mutations were purified with 90% purity by ion exchange and molecular size exclusion chromatography. The enzymatic activities were determined by isothermal microthermal titration method. The  $K_m$  of mutant E54K towards 1,2-dihexyl phosphate glycerol decreased by 0.39-fold compared with that of wild type hGIIE (WT), and the  $K_m$  of E54F towards 1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine increased by 1.93-fold than that of WT. The affinity of mutant proteins with phospholipid substrate was significantly changed, indicating that E54 plays an important role in the substrate head-group selectivity of hGIIE.

**Keywords:** secreted phospholipase A2, GIIE, recombinant expression, mutation, substrate head-group selectivity

分泌型磷脂酶 A2 (Secreted phospholipase A2, sPLA2) (EC3.1.1.4) 是一类分泌型的可以催化甘油磷脂 sn-2 位酯键水解的酶<sup>[1]</sup>。sPLA2 可以通过水解甘油磷脂从细胞膜或脂蛋白中释放溶血磷脂和游离脂肪酸, 这两种物质是很多生化反应的信号分子前体<sup>[2]</sup>。因而 sPLA2 可以通过发挥酶催化功能参与炎症、脂代谢等生理、病理过程<sup>[3-4]</sup>。

截至目前, 在哺乳动物中总共发现了 11 个 sPLA2 的家族成员, 包括 10 种具有催化活性的亚型 GIB、GIIA、GIIC、GIID、GIIE、GIIF、GIII、GV、GX、GXIIA 和一种无活性的亚型 GXIIB<sup>[1]</sup>。不同亚型具有不同的水解特异性和组织细胞定位, 因而具有不同的生理功能, 在炎症反应和脂质代谢等过程中起着协同或相反的作用<sup>[5]</sup>。sPLA2 成员具有如下特征: 1) 较小的分子量 14–19 kDa (GIII 除外); 2) 高度保守的钙结合环, 序列为 XCGXGG; 3) 保守的催化二联体 His-Asp (GXIIIB 除外); 4) 6 对以上二硫键, 结构非常稳定。

早在 2000 年, GIIE 被首次发现并进行了重组表达<sup>[6]</sup>。成熟的 GIIE 蛋白含有 123 个氨基酸, 含有 7 对二硫键, 分子量为 14 kDa。GIIE 在人体内的分布局限于脑、心、肺和胎盘中<sup>[7]</sup>。在大鼠中, GIIE 在脑组织和原代神经元中也有表达, 而且在大脑皮层和海马组织中含量较高<sup>[8]</sup>。

GIIE 在炎症反应的发生中起着关键作用。用脂多糖刺激小鼠, 会促进小鼠内 GIIE 的高表达, GIIE 可以通过硫酸乙酰肝素糖蛋白 (Heparan sulfate proteoglycan, HSPG) 通路促进花生四烯酸和前列腺素的释放, 也可以促进白三烯的产生和肥大细胞的脱颗粒<sup>[7]</sup>。GIIE 在过敏性皮炎的老鼠体内表达量升高<sup>[9]</sup>。

GIIE 与脂代谢相关。GIIE 在肥胖小鼠的脂肪细胞中大量表达, 它可改变脂蛋白中的磷脂组成, 调节磷脂酰丝氨酸 (PS) 和磷脂酰乙醇胺 (PE) 的比例, 促进脂质在脂肪组织和肝脏中的积累<sup>[10]</sup>。在 GIIE 敲除小鼠的脂肪组织中, 甘油三酯大量积

累,同时胞外调节蛋白激酶 (Extracellular signal regulated kinase, ERK) 和激素敏感型脂肪酶 (Hormone-sensitive lipase, HSL) 的磷酸化水平都明显降低<sup>[11]</sup>。外源补给 GIIE 蛋白后,脂肪水解恢复正常<sup>[11]</sup>。GIIE 可能通过 ERK/HSL 磷酸化信号通路,调节脂肪细胞中的脂质水解<sup>[11]</sup>。

为了揭示 GIIE 的催化和功能机制,笔者等解析了人源 GIIE (Human GIIE, hGIIE) 的晶体结构<sup>[12]</sup>。结果显示, hGIIE 的整体结构与 GIB、GIIA 和 GX 相类似,具有家族保守的催化二联体 His-Asp 和钙结合环。hGIIE 具有两个钙结合位点,其中一个为典型的钙结合环,和其他同家族成员一样,此处的钙离子为催化反应所必需<sup>[13]</sup>,参与底物结合和催化过程,另一个钙结合位点比较灵活,钙结合不稳定。当 hGIIE 结合抑制剂之后,活性口袋部位为了容纳抑制剂,21 位的氨基酸发生构象改变,带动邻位 D22 构象改变,破坏了第二个钙结合位点的钙结合。我们通过 N21 的突变实验证明 N21 通过影响钙的结合调节 hGIIE 的酶活性<sup>[14]</sup>。hGIIE 对酸性磷脂的水解活性比较低,与 GIIA 相比, hGIIE 底物结合界面的正电荷较少,这是 hGIIE 对酸性磷脂的水解活性较低的原因之一。底物与 GIIE 的复合物模型发现,位于 54 位的氨基酸,可能参与底物头基的结合<sup>[12]</sup>。因此,本研究通过突变实验旨在验证 E54 位氨基酸对 hGIIE 的底物头基的选择性,为分析 hGIIE 以及 sPLA2 家族其他成员的生理功能和进一步抑制剂药物设计提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和试剂

#### 1.1.1 菌株

克隆菌株大肠杆菌 *Escherichia coli* Top10, 表达菌株毕赤酵母 *Pichia pastoris* X33。

#### 1.1.2 质粒

pGAPZαA 购自 Invitrogen 公司。

#### 1.1.3 培养基

低盐 LB 培养基: 0.5% 酵母提取物, 0.5% NaCl, 1% 蛋白胨; 低盐 LB 固体培养基是在低盐 LB 中添加 1.5% 琼脂。YPD 培养基: 1% 酵母提取物, 2% 蛋白胨, 2% 葡萄糖; 抗生素 Zeocin 购自 Invitrogen 公司。

#### 1.1.4 酶

限制性内切酶 (*EcoR* I、*Xba* I 和 *Bln* I)、Solution I、PrimeSTAR HS DNA Polymerase 购自 TaKaRa 公司; 普通 *Taq* 酶购自康润生物 GenStar 公司。

#### 1.1.5 生化试剂

MES、Tris、NaCl (纯化用)、CaCl<sub>2</sub> 购自 Sigma 公司; 培养基用 NaCl 购自西陇化工。

### 1.2 PCR 引物的设计

根据人源分泌性磷脂酶 A2 GIIE 的基因序列 (GenBank/EMBL Accession No. NM\_014589) 设计并合成 E54 对应的突变体引物以及上、下游引物 (表 1)。上、下游引物对应的酶切位点分别为 *EcoR* I 和 *Xba* I。

表 1 GIIE 突变体的引物序列

Table 1 Primer sequence used to amplify mutated hGIIE

Primer name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
hGIIE	CCGGA <u>GAATTCAATCTGGTTCAGTTTGGCG</u>	CTAGT <u>CTAGATCAGCACGGCGGCGTTCGGGA</u>
E54A	TACGGCCGTCTGGCTAAACTGGGTT	CAACCCAGTTTAGCCAGACGGCCGT
E54F	ACGGCCGTCTGTTCAAACCTGGGTTG	CAACCCAGTTTGAACAGACGGCCGT
E54K	ACGGCCGTCTGAAGAAACTGGGTTG	CAACCCAGTTTCTTCAGACGGCCGT

Restriction enzyme sites including *EcoR* I and *Xba* I are underlined.

### 1.3 序列分析

用 Multialign 软件进行多序列比对分析, 结果用 ESPript 导出。

### 1.4 突变体目的基因的获得

以实验室保存的重组质粒 *hGIIIE-pGAPZαA* 为模板, 采用两步 PCR 法, 先分段扩增短的目的基因片段, 再通过重叠延伸 PCR 法<sup>[15]</sup>将短的目的基因片段拼接成全长基因片段。反应条件为: 94 °C 5 min; 98 °C 10 s, 53 °C 10 s, 72 °C 40 s, 循环 5 次; 98 °C 10 s, 56 °C 10 s, 72 °C 40 s, 循环 25 次; 72 °C 5 min。得到一个约 400 bp 的目的基因片段; 琼脂糖凝胶电泳后, 采用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的基因片段。

### 1.5 重组表达载体的构建

将扩增获得的突变体基因 E54A、E54F 和 E54K 片段以及质粒 *pGAPZαA* 分别用 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切处理。将酶切后的目的基因和质粒加入 Solution I 连接体系, 16 °C 连接 90 min, 连接产物转化 *E. coli* Top10 后, 涂布于低盐 LB (含 25 μg/mL Zeocin) 平板上, 37 °C 培养 12–16 h。挑取 LB 平板上的单克隆, 采用 *hGIIIE* 上游引物和质粒通用下游引物 3AOX, 进行菌落 PCR 鉴定。PCR 条件为: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 40 s, 循环 30 次; 72 °C 5 min。PCR 产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。阴性对照为空质粒。挑选菌落 PCR 鉴定的阳性克隆, 接种到 10 mL 低盐 LB 液体培养基中, 过夜培养。取菌液送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序分析。

### 1.6 重组毕赤酵母表达菌株的构建

将重组质粒 E54A/E54F/E54K-*pGAPZαA* 用 *Bln* I 限制性内切酶单酶切线性化处理。制备毕赤酵母感受态细胞。将线性化的质粒电转进入毕赤酵母感受态细胞后, 涂布于含 100 μg/mL Zeocin 的 YPD 平板上, 29 °C 避光培养 72 h。采用酵母菌落 PCR 鉴定阳性重组菌株。用 *hGIIIE* 上下游引物, 进行菌落 PCR。反应条件为: 预变性 95 °C 8 min;

变性 95 °C 30 s, 退火 55 °C 30 s, 延伸 72 °C 50 s, 循环 30 次; 终延伸 72 °C 1 min。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果, 阴性对照采用不含质粒的 X33 作为模板的 PCR 产物。挑取阳性克隆菌落于 10 mL YPD (含 100 μg/mL Zeocin) 培养基中, 29 °C、220 r/min 避光培养 48 h。SDS-PAGE 初步验证表达情况。

### 1.7 重组蛋白的表达和纯化

将重组毕赤酵母 X33-E54A/E54F/E54K-*pGAPZαA* 分别接种到添加了 Zeocin 的 YPD 培养基中, 避光培养 55 h 后, 高速冷冻离心收集上清液。将发酵液进行过滤除菌、浓缩换盐处理。采用 AKATA 纯化系统, 通过两步纯化法纯化蛋白。用阳离子交换柱 (SP, High performance) 进行初步纯化 (缓冲液 A: 50 mmol/L MES, pH 6.0; 缓冲液 B: 50 mmol/L MES, 1 mol/L NaCl, pH 6.0), 采用分子筛 Superdex 200 HiLoad 16/60 进行精细纯化, 缓冲液条件为 20 mmol/L Tris, 200 mmol/L NaCl, pH 8.8。

### 1.8 酶动力学参数的测定

本实验采用等温微量热滴定仪 Microcal ITC200 测定了 *hGIIIE* 对不同头基底物的选择性。底物包括 1,2-二己酰卵磷脂 (1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DHPC) 和 1,2-二己酰磷酸甘油 (1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphorrac-1-glycerol, DHPG)。反应缓冲液为 100 mmol/L Tris, 150 mmol/L KCl, 10 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5。首先清洗 ITC 样品池和滴定针, 用水上样, 使得样品池和滴定针中的样品均为水, 通过水滴实验检测 ITC 的清洁度; 然后清洗 ITC 样品池和滴定针, 更换参比池中的水; 准备底物母液, 配制 200 mmol/L 底物母液, 其中 DHPG 用水溶解, DHPC 用 DMSO 溶解; 准备底物工作液并上样, 用缓冲液稀释底物母液, DHPG、DHPC 的浓度分别为 20 mmol/L 和 50 mmol/L, 取 60 μL 到小 EP 管中, 按照系统程序上样到注射器; 准备蛋白样

品, 蛋白母液的缓冲液为反应缓冲液, 将蛋白稀释到终浓度为  $2 \mu\text{mol/L}$ , 为保证蛋白和底物的缓冲液完全一致, 需要在蛋白溶液中加入等量的水或者 DMSO, 准备  $300 \mu\text{L}$  样品加入到 ITC 样品池中, 保证无气泡; 设置反应参数并开始实验, 本实验采用螺旋桨滴定针, 搅拌速度设为  $750 \text{ r/min}$ ; 采用多点连续滴定法, 每滴  $3 \mu\text{L}$ , 总共 13 滴, 反应间隔  $120 \text{ s}$ ; 填写对应注射器中底物浓度和样品池中蛋白浓度, 确认无误后, 开始实验; 测定反应焓变  $\Delta H$ : 采用单点滴定法测定焓变, 每滴  $6 \mu\text{L}$ , 反应时长  $1800 \text{ s}$ , 底物浓度和蛋白浓度与上面一致; 采用 Origin 软件进行数据处理, 求得  $K_m$  和  $k_{\text{cat}}$  值。

## 2 结果与分析

### 2.1 hGIIIE 的 E54 突变位点分析

hGIIIE 属于分泌性磷脂酶 A2 (sPLA2) 的成员之一, 催化活性中心具有保守的催化二联体 His46 和 Asp90 (图 1A)。hGIIIE 为金属酶, 具有两个钙结合位点 (图 1A)。除了活性位点氨基酸 H46 和 Ca1 之外, 活性口袋附近的氨基酸 E54、K61 也参与了底物的结合过程 (图 1B)。

将 hGIIIE 与其他同家族的人源的 sPLA2 成员在催化口袋区域进行了序列比对分析, 第 54 位的氨基酸相对保守, GIIIE、GIIA、GV 和 GX 在此位点均为谷氨酸 (E), GIID 和 GIB 在 54 位为赖氨酸 (K), GIIF 在 54 位为苯丙氨酸 (F) (图 2)。为了验证 E54 对底物磷酸头基的选择性, 我们将 hGIIIE 的 E54 分别突变为 K、F 和 A。

### 2.2 突变体基因的克隆和重组菌株的构建

为实现 hGIIIE 突变体 E54A、E54F 和 E54K 在毕赤酵母中的重组表达, 我们以野生型质粒 hGIIIE\_pGAPZ $\alpha$ A 为模板, 采用重叠延伸 PCR 法获得了突变体目的基因 (图 3), 并通过 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切连接到载体 pGAPZ $\alpha$ A 中。测序结果表明 hGIIIE 基因和载体连接正确。将获得的重组质粒经过 *Bln* I 线性化处理, 电转进入毕赤酵母

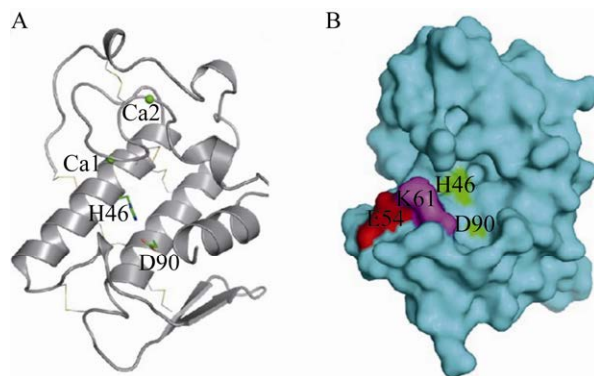


图 1 hGIIIE 的晶体结构模型

Fig. 1 Crystal structure of human secreted phospholipase A2 group IIE (PDB: 5WZM<sup>[12]</sup>). (A) Structure of hGIIIE shown in cartoon representation. The catalytic dyad H46 and D90 are shown as green sticks. Calcium ions are shown as green spheres. (B) Structure of hGIIIE shown in surface representation. Residues E54 and K61 near the active pocket are labeled.

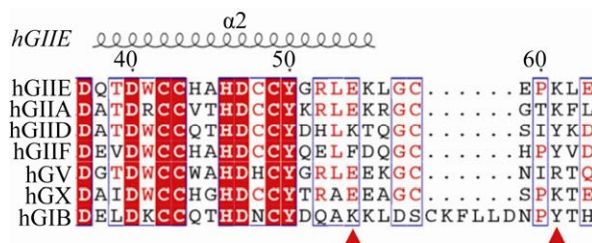


图 2 hGIIIE 与同家族其他成员在活性口袋部位的氨基酸序列比对分析

Fig. 2 Multiple sequences alignments of hGIIIE with other human sPLA2s in the active pocket. Residues are shown in white on the red background in case of strict identity. Secondary structure elements of hGIIIE are shown at the top. Residue in position 54 and 61 are marked in red triangle. Multialignment is performed using the program Multialign<sup>[16]</sup> and ESPript 3.0<sup>[17]</sup>.

X33, 利用 YPD 平板 (含  $100 \mu\text{g/mL}$  抗生素 Zeocin) 筛选阳性重组子。

### 2.3 突变体蛋白在酵母菌株中的表达及纯化

将 hGIIIE 突变体 E54A、E54F 和 E54K 对应的阳性重组子用含有  $100 \mu\text{g/mL}$  抗生素 Zeocin 的液体 YPD 培养基进行扩大培养  $55 \text{ h}$ , 实现 hGIIIE 突变体在毕赤酵母中的分泌性组成型表达; 高速冷冻离心之后, 保留上清液; 对上清液进行过滤、

浓缩预处理;上清液通过阳离子 SP 柱进行初步纯化, 然后再通过分子筛 Superdex 200 进行精细纯化。结果显示, 样品经过阳离子柱初步纯化, SDS-PAGE 结果显示的峰尖蛋白纯度已经达到 90% 以上 (图 4A-C), 因为多数酵母内源蛋白为酸性蛋白, 在酸性条件下带负电, 不能够吸附到阳离子交换柱上, 而 hGIIE 预测的等电点为 pH 8.3, 在酸性条件下带正电, 可以牢牢地吸附在阳离子柱 SP 上, 因而可以通过低盐洗脱去除掉杂蛋白, 来分离目的蛋白。我们通过分子排阻 Superdex 200 对蛋白进行状态分析, 发现 hGIIE 突变体蛋白 E54A、E54F 和 E54K 分子筛的出峰位置在 19.5 mL 左右, 而且峰形单一对称。蛋白纯度高达 90% 以上, 状态均一, 可用于后续酶活性测定。

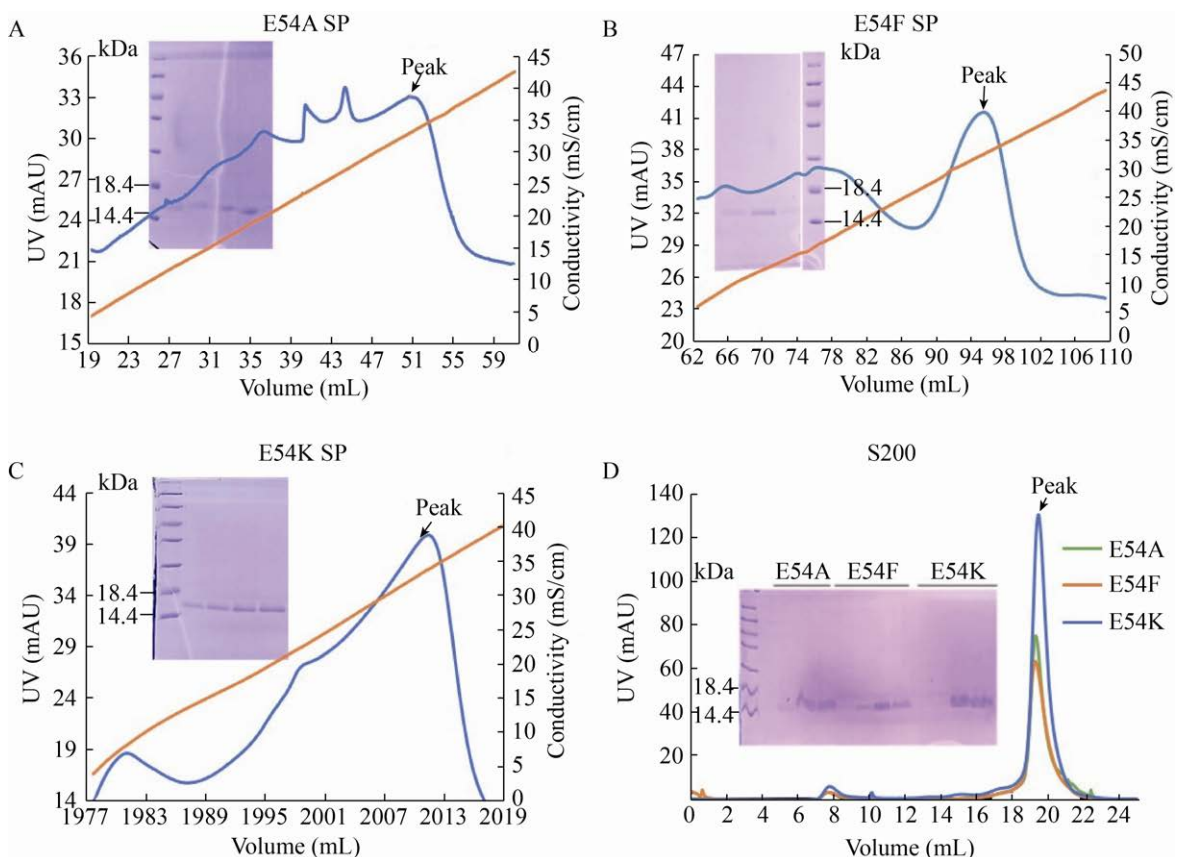


图 4 hGIIE 突变蛋白的纯化结果

Fig. 4 Purification of mutants E54A, E54F and E54K by ion exchange SP column and size exclusion chromatography. (A-C) Ion exchange SP column results of mutants E54A, E54F and E54K. (D) Superdex 200 chromatography result of mutants E54A, E54F and E54K. SDS-PAGE analysis of the peak samples is inserted.

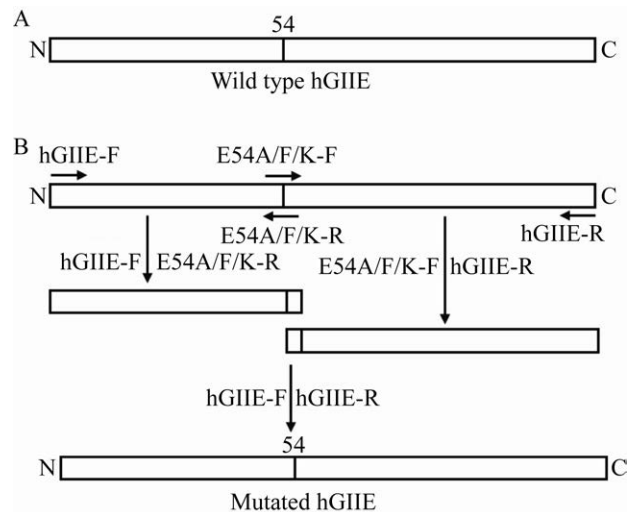


图 3 hGIIE 突变体基因的两步 PCR 法扩增

Fig. 3 Scheme of hGIIE mutagenesis by overlap extension PCR. Arrows indicate the primers used in PCR.

## 2.4 突变体蛋白的酶动力学参数的测定

采用等温微量热滴定仪测定了纯化后的 hGIIE 突变体蛋白对底物 DHPG 和 DHPG 的底物选择性 (图 5)。结果显示, 相比于 hGIIE 野生型蛋白, 突变体蛋白与 DHPG 和 DHPG 的亲和力均发生了改变, 其中突变体 E54K 与 DHPG 的  $K_m$  值为 WT 的 0.39 倍, 亲和力明显增强。而突变体 E54F 与 DHPG 的  $K_m$  值增大, 为 WT 的 1.93 倍, 亲和力明显减弱 (表 2)。突变体蛋白的转换数  $k_{cat}$  降低, 为 WT 的 0.13–0.39 倍。说明 E54 在 GIIE 的磷脂底物选择性水解过程中起着重要作用。

## 3 讨论

sPLA2 与哮喘、风湿性关节炎等炎症疾病以及动脉粥样硬化、高血脂等代谢性疾病密切相关。sPLA2 可以通过发挥酶催化功能参与机体的生理和病理过程。

hGIIE 具有不同于其他 sPLA2 的底物偏好性。多数 sPLA2 的最适底物为酸性磷脂 PG, 其中 hGIIA 对 PG 的水解活性最高。hGIIE 虽然与 hGIIA 具有较高的序列相似性, 但是对 PG 无水解偏好性。因为 hGIIE 在 N 端和 C 端区域具有较多

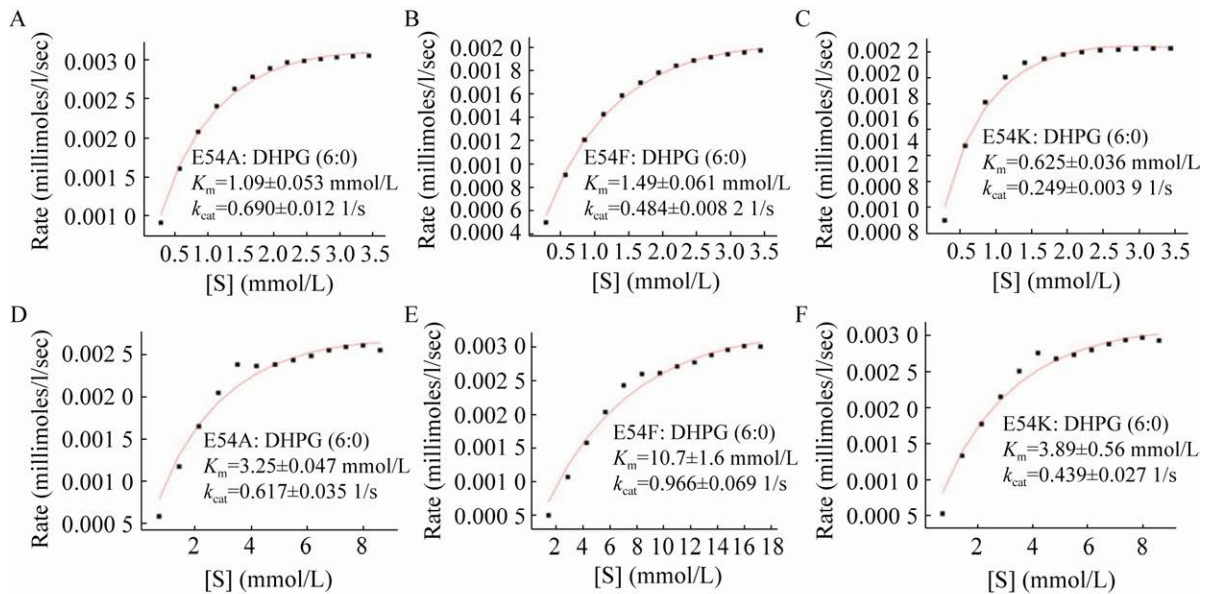


图 5 等温微量热滴定仪测定 hGIIE 突变体蛋白的底物选择性

Fig. 5 Phospholipid head group selectivity of hGIIE determined by isothermal titration calorimetry method. (A–C) 1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphor-rac-1-glycerol (DHPG). (D–F) 1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3phosphocholine (DHPG). Heat flows are converted to specific enzyme activities. Data is fitted to the standard Michaelis-Menten equation, trend line is shown in red.

表 2 hGIIE 野生型和突变体对底物 DHPG 和 DHPG 的动力学常数

Table 2 Kinetic parameters of wild type and mutant hGIIE

	DHPG (6:0)			DHPG (6:0)		
	$K_m$ (mmol/L)	$k_{cat}$ (1/s)	$k_{cat}/K_m$	$K_m$ (mmol/L)	$k_{cat}$ (1/s)	$k_{cat}/K_m$
WT	$1.62 \pm 0.06$	$1.76 \pm 0.03$	1.09	$5.52 \pm 1.00$	$3.22 \pm 0.30$	0.58
E54A	$1.09 \pm 0.05$	$0.69 \pm 0.01$	0.63	$3.25 \pm 0.47$	$0.62 \pm 0.04$	0.19
E54F	$1.49 \pm 0.06$	$0.48 \pm 0.01$	0.32	$10.70 \pm 1.60$	$0.97 \pm 0.07$	0.09
E54K	$0.63 \pm 0.04$	$0.25 \pm 0.01$	0.40	$3.89 \pm 0.56$	$0.44 \pm 0.03$	0.11

的不带电氨基酸,对酸性底物 PG 的识别结合作用较弱<sup>[12]</sup>。相反, hGIIA 在 N 端和 C 端区域具有较多的碱性氨基酸,而且将 N 端的碱性氨基酸 R7 和 K10 突变为酸性氨基酸后,它对 PG 的亲合力减弱 45 倍<sup>[18]</sup>。

GIIE 敲除小鼠实验显示, GIIE 通过选择性释放溶血磷脂酰乙醇胺 (Lysophosphatidylethanolamine, LPE) 来调节小鼠皮肤稳态<sup>[9]</sup>。在脂蛋白颗粒中, 磷脂酰胆碱 (Phosphatidylcholine, PC) 为其中的主要成分,然而 GIIE 却对脂蛋白颗粒中含量极少的磷脂酰乙醇胺 (Phosphatidylethanolamine, PE) 和磷脂酰丝氨酸 (Phosphatidylserine, PS) 具有水解偏好性<sup>[19]</sup>。这些底物与 hGIIE 的对接模型显示, 底物 PC、PE、PS 和 PG 头基上的磷酸基团均可以与 K61 形成盐键, 61 位的氨基酸决定了 hGIIE 具有催化磷脂水解的特性。除底物 PC 外, PE、PS 和 PG 均可以与 hGIIE 的 E54 形成氢键相互作用, E54 与 PE 形成一个氢键相互作用, 与 DHPG 形成两个氢键相互作用, 但与 DHPC 未形成氢键相互作用。说明 E54 可能在 hGIIE 选择性水解磷脂发挥生理功能的过程中起着重要作用<sup>[12]</sup>。

本研究对 E54 进行了突变, 通过大量表达纯化, 获取目的蛋白, 并验证 E54 对 hGIIE 底物选择性的影响。由于缺乏商品化的 hGIIE 特异性抗体, 且目的蛋白两端没有连接可供检测的标签, 所以文中未对目的蛋白进行 Western 定性分析。hGIIE 等电点预测值为 pH 8.3, 分子量为 14 kDa, 且具有催化磷脂水解的活性。本研究通过阳离子交换收集碱性蛋白, 并通过 SDS-PAGE 确定目的蛋白分子量为 14 kDa, 通过 ITC 测定纯化后的蛋白具有催化磷脂水解的活性, 由此得出所获得的蛋白为 hGIIE 蛋白。E54 突变为碱性氨基酸 K 后, 与酸性磷脂 PG 的亲合力明显提高。PG 的甘油羟基均可与谷氨酸 E 和赖氨酸 K 的侧链形成氢键相互作用。推测 E54K 突变体通过创造局部碱性环境, 促进了酸性磷脂底物 PG 的结合。hGIB 对酸

性磷脂 PG 的水解活性为 hGIIE 的 2 000 倍<sup>[20]</sup>, 可能的原因之一为 hGIB 在 54 位的碱性氨基酸 K 对酸性磷脂的选择性。而将 E54 突变为较大的疏水氨基酸 F 后, 由于空间位阻, hGIIE 突变体蛋白与中性磷脂 PC 的亲合力显著减弱。GIIF 的 54 位的疏水氨基酸 F 对磷脂底物 PC 的空间位阻可能导致其 PC 的水解活性最低<sup>[20]</sup>。hGIIE 突变体 E54F 和 E54K 与不同磷脂底物亲和力的显著变化证明 E54 在 hGIIE 的选择性水解磷脂底物过程中发挥重要作用。E54 突变为疏水氨基酸 A 和 F、碱性氨基酸 K 之后, hGIIE 突变体蛋白对底物 PG 和 PC 的转换数  $k_{cat}$  均减小。可能是由于 E54 位于 hGIIE 蛋白的典型钙结合环对面, 典型钙结合环周边的酸性环境有利于催化必需基团——钙离子的结合。将 E54 突变为碱性或电中性氨基酸之后, 可能会影响 hGIIE 的钙结合, 进而影响了酶催化效率。

## 4 结论

本研究采用重叠延伸 PCR 法对 hGIIE 蛋白在 E54 位点进行了定点突变, 分别突变为丙氨酸 (A)、苯丙氨酸 (F) 和赖氨酸 (K); 并采用毕赤酵母组成型分泌表达系统对这 3 个突变体进行了表达; 采用阳离子交换和分子排阻两步纯化法对蛋白进行了纯化; 最后采用等温微量热测定仪对纯化后的蛋白进行了活性测定。相比野生型 hGIIE 蛋白, E54 突变体对底物 PG 和 PC 的亲合力发生了明显变化, 说明 E54 是决定 hGIIE 底物头基选择性的关键氨基酸。

## REFERENCES

- [1] Murakami M, Taketomi Y, Sato H, et al. Secreted phospholipase A<sub>2</sub> revisited. *J Biochem*, 2011, 150(3): 233-255.
- [2] Murakami M, Taketomi Y, Miki Y, et al. Emerging roles of secreted phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: the 3rd edition. *Biochimie*, 2014, 107: 105-113.



- [3] Murakami M, Taketomi Y, Miki Y, et al. Recent progress in phospholipase A<sub>2</sub> research: from cells to animals to humans. *Progr Lipid Res*, 2011, 50(2): 152-192.
- [4] Quach ND, Arnold RD, Cummings BS. Secretory phospholipase A<sub>2</sub> enzymes as pharmacological targets for treatment of disease. *Biochem Pharmacol*, 2014, 90(4): 338-348.
- [5] Murakami M, Sato H, Miki Y, et al. A new era of secreted phospholipase A<sub>2</sub>. *J Lipid Res*, 2015, 56(7): 1248-1261.
- [6] Suzuki N, Ishizaki J, Yokota Y, et al. Structures, enzymatic properties, and expression of novel human and mouse secretory phospholipase A<sub>2</sub>s. *J Biol Chem*, 2000, 275(8): 5785-5793.
- [7] Murakami M, Yoshihara K, Shimbara S, et al. Arachidonate release and eicosanoid generation by group IIE phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 292(3): 689-696.
- [8] Kolko M, Christoffersen NR, Barreiro SG, et al. Characterization and location of secretory phospholipase A<sub>2</sub> groups IIE, V, and X in the rat brain. *J Neurosci Res*, 2006, 83(5): 874-882.
- [9] Yamamoto K, Miki Y, Sato H, et al. Expression and function of group IIE phospholipase A<sub>2</sub> in mouse skin. *J Biol Chem*, 2016, 291(30): 15602-15613.
- [10] Sato H, Taketomi Y, Ushida A, et al. The adipocyte-inducible secreted phospholipases PLA2G5 and PLA2G2E play distinct roles in obesity. *Cell Metabol*, 2014, 20(1): 119-132.
- [11] Zhi H, Qu LB, Wu F, et al. Group IIE secretory phospholipase A<sub>2</sub> regulates lipolysis in adipocytes. *Obesity*, 2015, 23(4): 760-768.
- [12] Hou SL, Xu TT, Xu JX, et al. Structural basis for functional selectivity and ligand recognition revealed by crystal structures of human secreted phospholipase A<sub>2</sub> group IIE. *Sci Rep*, 2017, 7: 10815.
- [13] Scott DL, White SP, Otwinowski Z, et al. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A<sub>2</sub>. *Science*, 1990, 250(4987): 1541-1546.
- [14] Hou SL, Zhang YL, Xu JX, et al. Residue Asn21 acts as a switch for calcium binding to modulate the enzymatic activity of human phospholipase A<sub>2</sub> group IIE. *Biochimie*, 2020, 176: 117-121.
- [15] Ge LM, Rudolph P. Simultaneous introduction of multiple mutations using overlap extension PCR. *Biotechniques*, 1997, 22(1): 28-30.
- [16] Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(22): 10881-10890.
- [17] Robert X, Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(W1): W320-W324.
- [18] Snitko Y, Koduri RS, Han SK, et al. Mapping the interfacial binding surface of human secretory group IIa phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochemistry*, 1997, 36(47): 14325-14333.
- [19] Yamamoto K, Miki Y, Sato H, et al. Secreted phospholipase A<sub>2</sub> specificity on natural membrane phospholipids. *Methods Enzymol*, 2017, 583: 101-117.
- [20] Singer AG, Ghomashchi F, Le Calvez C, et al. Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A<sub>2</sub>. *J Biol Chem*, 2002, 277(50): 48535-48549.

(本文责编 郝丽芳)