

# 计算机模拟短小芽孢杆菌木聚糖酶与底物木聚糖的对接 Molecular Docking of *Bacillus Pumilus* Xylanase and Xylan Substrate Using Computer Modeling

林锦霞<sup>1,2</sup>, 张燎原<sup>1,2</sup>, 张光亚, 方柏山\*

LIN Jin-Xia<sup>1,2</sup>, ZHANG Liao-Yuan<sup>1,2</sup>, ZHANG Guang-Ya and FANG Bai-Shan\*

1 工业生物技术福建省高等学校重点实验室(华侨大学), 泉州 362021

2 华东理工大学, 上海 200237

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Hua Qiao University, Fujian Quanzhou, 362021

2 East China University of Science and Technology, Shanghai, 200237

**摘 要** 克隆测序短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)木聚糖酶基因,在同源建模所得三维结构的基础上寻找底物结合可能的活性口袋,用计算机模拟其与底物木聚糖的对接,预测酶与催化反应过程的关键氨基酸残基。所得的信息对木聚糖酶的定向改造有重要意义。

**关键词** 分子对接,短小芽孢杆菌木聚糖酶,活性口袋

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0715-04

**Abstract** *Bacillus pumilus* xylanase was cloned and sequenced. Based on the tertiary structure that originated from homology modeling, the potential active pocket was searched and ligand-protein docking was performed using relative softwares. The information extracted from the molecular docking is analyzed; several amino acid residues might play a vital role in the xylanase catalytic reaction are obtained to instruct the further modification of xylanase directed-evolution.

**Key words** molecular docking, *Bacillus pumilus* xylanase, active pocket

木聚糖酶( EC 3.2.1.8 )在麦秆、玉米芯和硬木等农业废物的利用过程中起降解木聚糖的作用。目前对微生物木聚糖酶的研究主要集中于不同条件下酶的生产、纯化、理化性质、分子克隆表达及其在纸浆预漂中的应用<sup>[1,2,3]</sup>。因此,对催化反应过程中木聚糖酶如何与底物发生作用的研究仍是必要。

分子对接(Molecular docking)是将小分子配体对受到受体的活性位点,并搜寻其合理的取向和构象,

使得配体与受体的形状和相互作用的匹配最佳。根据配体与受体作用的“锁钥原理”(lock and key principle),分子对接可以有效地确定与靶受体活性部位空间和电性特征互补匹配的小分子化合物。在药物设计中,分子对接方法主要用来从化合物数据库中搜寻与受体生物大分子有较好亲和力的小分子,从而发现全新的先导化合物。分子对接技术还为探讨相关蛋白分子间作用提供了一种有效的研究

Received : December 6 , 2006 ; Accepted : January 16 , 2007 .

This work was supported by the grants from the National " 973 " Project ( No. 2007CB707804 ), National Natural Science Foundation of China( No. 20446004 , 20676048 ), and Science and Technology Foundation of Fujian, China( No.20031020 ) .

\* Corresponding author. Tel : + 86-595-22691560 ; E-mail : fangbs@hqu.edu.cn

国家 973 重点基础研究发展规划项目( No.2007CB707804 ) 国家自然科学基金( No.20046004 , 20676048 )和福建省科技基金( No.20031020 )资助。

手段。分子对接由于从整体上考虑配体与受体的结合效果,所以能较好地避免其他方法中容易出现的局部作用较好,整体结合欠佳的情况<sup>[4,5]</sup>。

本文以同源建模的短小芽孢杆菌木聚糖酶三级结构为基础,利用分子对接模拟木聚糖酶与底物木聚糖发生作用,寻找潜在的活性氨基酸残基,探讨酶与底物的作用机制,为后续的木聚糖酶的定向改造奠定基础。

### 1 材料与方法步骤

#### 1.1 材料

*Bacillus pumilus*; DNA 克隆试剂; Pentium 微机; 国际互联网上的生物信息学数据库; 对接软件 molsoft; 可视化软件, 如 Rasmol, spdbv, chimera。

#### 1.2 方法及步骤

1.2.1 短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)木聚糖酶基因(*xynA*)克隆按分子生物学手册操作, 测序由北京华诺公司完成, 返回的测序结果翻译成蛋白质与不同来源的木聚糖酶氨基酸序列比对。

1.2.2 同源建模在服务器 SWISS - MODEL 进行。

1.2.3 建模后的结果用 icmPocketFinder 程序寻找与可能底物结合的活性口袋。

1.2.4 根据需要编辑对接的受体和配体, 模拟木聚糖酶与底物木聚糖对接。

1.2.5 分析对接结果。

### 2 结果与分析

2.1 短小芽孢杆菌木聚糖酶基因测序结果及多序列比对

短小芽孢杆菌木聚糖酶基因克隆后测序结果如图 1, NCBI ID 为 EF090270。翻译为氨基酸序列并与不同来源的木聚糖酶氨基酸序列进行 ClustalW 比对, 结果如图 2, 不同来源的木聚糖酶序列与短小芽孢杆菌木聚糖酶序列的比对罚分分别为 30, 39, 44, 44, 49, 43, 44, 66。图中大方框内为 Prosite 所报道的两个保守序列 [PSA][LQ]<sub>x</sub>-E-Y-Y-[LIVM]<sub>K</sub>(2)-[DE]<sub>x</sub>-[FYWHN]和[LIVMF]<sub>x</sub>(2)-E-[AG][YWG]-[QRFGS][SG][STAN]-G-x-[SAF]; 小方框内为两个保守的 Glu 残基。

#### 2.2 同源建模

提交短小芽孢杆菌木聚糖酶氨基酸序列到 Swiss-model 服务器, 同源建模返回的结构在 Rasmol 可视化, 如图 3。三级结构含 2 个  $\alpha$ -螺旋, 20 个  $\beta$ -折叠, 19 个 loop 环, 最后的总能量为 -8600.900

```
ATGAAITTGAGAAAAATTAAGACTGTGGTTTGTGTGATGTGTATTGGACTGACGCGTTATACTG
ACGGCTGTACCAGCCCATCGAGAACCAATTACGAATAATGAAATGGTTAACCATACGG
GGTACGATTATGAAATTATGGAAGGATTATGAAATACCTCGATGACACTCAATAACCGC
GGCGCTTTAGTCCAGGCTGGAAACAATATCGGAAATGCTTTATTAGAAAAGGGAAAA
AATGTTGATTCCTCACTGAACCTCACCATCACTGGCAACATCTCCCATCAATTACAACGCA
AGTTTTAAACCCAGGCGGGAATTCCTATCTATGTGTCTATGGCTGGACACAACTCCATTA
GCAGAACTACTACATTTGATTTCATGGGCGAGTATGTCCTCAACAGGAGCGGTATAAAGG
ATCATTTTATGCTGATGGAGGCACATATGACATTTATGAAACAACCCGTGTCATCAGCC
TTCCATTATCGGGATCGCAACCTTCAAGCAATATTGGAGTGTAAGTCAAACGAAACGTA
CAAGCGGAACGGTCTCCGTCAGTGGCATTTTAGAAAATGGGAAAGCTTAGGATGCCC
AATGGGAAATGTATGAAACCGCATTTACTGTAGAAAGGCTACCAAAAGCAGCGGGAAT
GCAAAATGTGATGACCAATCAGCTGTTTATTGGCAACATCCGAGCATCA
```

图 1 短小芽孢杆菌木聚糖酶基因克隆测序结果

Fig. 1 The sequencing result of *B. pumilus* xylanase

```
Aspergillus      STAITP-SATPSPSSSSV-APFVDWNP-SAPFYIPWNP-DVYFCSFSTL-ITPSSVSGT 134
Ascochyta       AP-ITP-SATPSPSSSSV-APFVDWNP-SAPFYIPWNP-DVYFCSFSTL-ITPSSVSGT 145
Suttilis        FRLINFNAGWQAPRNGN-VYLNGOTRSLIEEYFVVDSD-VEFTG-ITXSTVRSOGGT 132
Paenibacillus  FRLINFNAGWQAPRNGN-VYLNGOTRSLIEEYFVVDSD-VEFTG-ITXSTVRSOGGT 132
Circulian       FRLINFNAGWQAPRNGN-VYLNGOTRSLIEEYFVVDSD-VEFTG-ITXSTVRSOGGT 134
Aeromonas       KLVVYVYVAGVAPRNGN-VYLNGOTRSLIEEYFVVDSD-VEFTG-ITXSTVRSOGGT 101
Streptomyces   HIL-INY-NRSPRSGGSE-VLNGVUTLDELVYVVDSD-VEFTG-ITXSTVRSOGGT 154
pumilus         HIL-INY-NRSPRSGGSE-VLNGVUTLDELVYVVDSD-VEFTG-ITXSTVRSOGGT 148
sp              HIL-INY-NRSPRSGGSE-VLNGVUTLDELVYVVDSD-VEFTG-ITXSTVRSOGGT 149
Aspergillus     YQVETITRSLIEEYFVVDSD-VEFTG-ITXSTVRSOGGT-VEFTG-ITXSTVRSOGGT 189
Ascochyta       YL-AU-ORLIDP-SL-DG-TLTPGUSVNRKLSGSS-SEVMDL-ELTAAAGK-RL-TH 204
Suttilis        YL-YT-TRYSAPSLDGLNPLS-QUSVNRKLSGSS-SEVMDL-ELTAAAGK-RL-TH 192
Paenibacillus  YL-YT-TRYSAPSLDGLNPLS-QUSVNRKLSGSS-SEVMDL-ELTAAAGK-RL-TH 192
Circulian       YL-YT-TRYSAPSLDGLNPLS-QUSVNRKLSGSS-SEVMDL-ELTAAAGK-RL-TH 163
Aeromonas       YL-YT-TRYSAPSLDGLNPLS-QUSVNRKLSGSS-SEVMDL-ELTAAAGK-RL-TH 190
Streptomyces   YL-YT-TRYSAPSLDGLNPLS-QUSVNRKLSGSS-SEVMDL-ELTAAAGK-RL-TH 214
pumilus         YL-YT-TRYSAPSLDGLNPLS-QUSVNRKLSGSS-SEVMDL-ELTAAAGK-RL-TH 201
sp              YL-YT-TRYSAPSLDGLNPLS-QUSVNRKLSGSS-SEVMDL-ELTAAAGK-RL-TH 200
Aspergillus     NYQVWATGSGVSSGSAHYVHTIIG 134
Ascochyta       NYQVWATGSGVSSGSAHYVHTIIG 145
Suttilis        NYQVWATGSGVSSGSAHYVHTIIG 132
Paenibacillus  NYQVWATGSGVSSGSAHYVHTIIG 132
Circulian       NYQVWATGSGVSSGSAHYVHTIIG 134
Aeromonas       NYQVWATGSGVSSGSAHYVHTIIG 101
Streptomyces   NYQVWATGSGVSSGSAHYVHTIIG 154
pumilus         NYQVWATGSGVSSGSAHYVHTIIG 148
sp              NYQVWATGSGVSSGSAHYVHTIIG 149
```

图 2 不同来源木聚糖酶的多序列比对

Fig. 2 The multi-alignment of xylanase from different origins

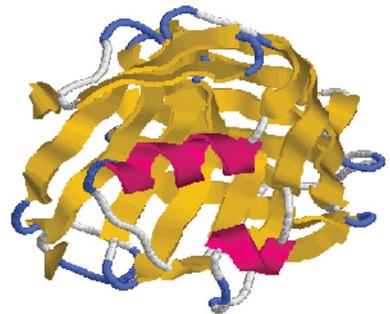


图 3 同源建模返回的短小芽孢杆菌木聚糖酶三维结构

Fig. 3 The tertiary structure of *B. pumilus* xylanase from homology modeling

#### 2.3 寻找可能与底物结合的活性口袋

用 Molsoft 软件寻找同源建模后的短小芽孢杆菌木聚糖酶可能与底物结合的活性口袋。搜索得 1 个活性口袋, 如图 4。活性口袋处的氨基酸残基有 23, 25, 50, 52, 54, 84 ~ 86, 90, 92, 99, 101, 109, 111, 112, 131, 133, 136 ~ 139, 145, 147, 149, 188, 190。

#### 2.4 模拟分子对接

虽然 PDB 中还没有报道 *B. pumilus* 木聚糖酶的晶体结构, 但其同属的环状芽孢杆菌(*Bacillus*)



测活搜索的活性口袋中的 Tyr 可能在酶与底物催化反应过程中起重要作用。对接后各个活性氨基酸残基与底物的位置关系如图 7 所示。

表 3 *B. pumilus* 木聚糖酶与底物木聚糖发生作用的残基及键长(来自分子对接)

Table 3 The residues and bonds' length of *B. pumilus* xylanase from the docking results

Substrate ring	Amino acid	Distance( $\times 10^{-1}$ nm)
Xyl 1	Asn 84	2.51
	Asn 84	2.21
	Tyr 86	2.67
Xyl 2	Glu 99	2.50
	Arg 133	2.70
	Arg 133	2.78
	Gln 147	2.14
	Gln 147	2.56
	Pro 137	2.41

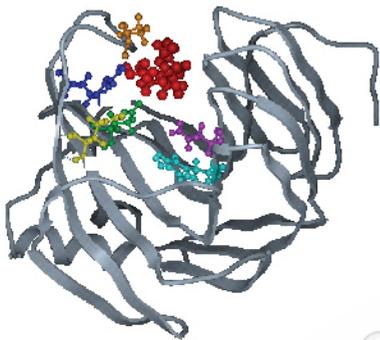


图 7 木聚糖酶与木聚糖底物对接后示意图, 彩色标注的残基为活性残基

Fig. 7 The detailed docking structure of xylanase and xylan, the active residues were marked by colours

除了两个保守残基谷氨酸(如图 2 中小方框所示)如果与一般的酸性或碱性催化剂形成氢键的是 Asn 残基,那么此木聚糖酶就是所谓的碱性木聚糖酶。对本试验的 *B. pumilus* 产木聚糖酶的条件考察发现,本菌株具有较好的碱耐受性。从对接的结构信息中发现 Asn84 在催化反应过程中分别与同一个木糖环的 O1, O2 两个原子形成氢键,推测 Asn84 可能在碱性木聚糖酶中起催化残基作用。

### 3 小结

分子对接是计算机辅助药物设计的重要组成部分,也是研究小分子配体与受体生物大分子间相互作用规律,预测其结合模式和亲和力的一种有效方法。对接计算时,将配体分子放到受体活性位点附

近,按照几何互补、能量互补以及化学环境互补的原则来实时评价配体与受体相互作用的好坏,并找到两个分子之间最佳的结合模式<sup>[7]</sup>。在蛋白质与配体小分子的相互作用中,评价函数(scoring function)和搜索算法(global optimization)是两个关键问题<sup>[5]</sup>,但起重要作用和主要作用的是配体周围几个 Å 范围内的残基,因此活性部位的大小对接结果有影响,有必要找到合适的活性部位<sup>[8]</sup>。本次对接选取配体周围 5Å 的残基进行对接时,各项网格能量(grid energy)的 RMSD 均比选取 3Å 或 7Å 进行对接的 RMSD 低。这说明与后者(3Å 或 7Å)相比,前者(5Å)的活性口袋包含的重要残基数比较多,具有一定的可靠性。在 PDB 未报道 *B. pumilus* 木聚糖酶晶体结构的情况下,模拟 *B. pumilus* 木聚糖酶与底物木聚糖的对接可预测催化反应过程中关键的氨基酸残基及其与底物的相互作用,为后续木聚糖酶的定向改造奠定了理论基础。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Kulkurni N, Shendye A, Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Review*, 1999, **23**: 411 - 456.
- [2] Saha BC. Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. *Process Biochem*, 2002, **37**: 1279 - 84.
- [3] Badhan AK, Chadha BS, Sonia KG, et al. Functionally diverse multiple xylanase of thermophilic fungus *Miceliophthora* sp. IMI 387099. *Enzyme Microb Technol*, 2004, **35**: 460 - 466.
- [4] Brenk R, Vetter SW, Boyce SE. Probing molecular docking in a charged model binding site. *J Mol Biol*, 2006, **357**: 1449 - 1470.
- [5] Kai K, Tonghua L, Tongcheng C, et al. A novel global optimization algorithm and its application in molecular docking. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2006, **82**: 248 - 259.
- [6] Wakarchuk Warren W, Campbell Robert L, Sung Wing L, et al. Mutational and crystallographic analyses of the active site residues of the *Bacillus circulans* xylanase. *Protein Science*, 1994, **3**: 467 - 475.
- [7] Zhi Y (支轶), Wu YZ (吴玉章), Wan Y (万瑛), et al. Molecular docking simulations of low-affinity CTL epitopes and its analogue derived from carcinoembryonic antigen. *Immunological Journal* (免疫学杂志), 2005, **21**(6): 514 - 517.
- [8] Zhao WN (赵文娜), Zou JW (邹建卫), Yu QS (俞庆森), et al. Influence of magnesium ion on molecular docking based on HPPK. *Acta Chimica Sinica* (化学学报), 2005, **63**(5): 434 - 438.