



## 长双歧杆菌N-乙酰氨基己糖1-位激酶的活性位点

关婉怡<sup>#</sup>, 白静<sup>#</sup>, 周天惠, 赵宝华<sup>\*</sup>

河北师范大学生命科学学院, 河北 石家庄 050024

**摘要:** 【目的】研究长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*) JCM1217的N-乙酰氨基己糖1-位激酶(N-acetylhexosamine 1-kinase, NahK)中对催化活性有影响的位点。【方法】利用点突变试剂盒, 获得NahK的4个位点的共10种单点突变体表达菌株。诱导表达并纯化野生型和突变体酶, 用DNS法和NADH偶联的微孔板分光光度法检测野生型及突变体酶的最适pH和最适Mg<sup>2+</sup>浓度, 并测定酶促反应动力学参数。【结果】D208A、D208N、D208E和I24A四种突变体的催化活性几乎丧失。突变体H31A、H31V、F247A和I24V的最适pH由野生型的7.5变为7.0, 突变体H31A和F247A的最适Mg<sup>2+</sup>浓度由野生型的5 mmol/L变为10 mmol/L。反应动力学参数测定结果表明, 突变体F247Y对底物GlcNAc/GalNAc及ATP的催化活性均高于野生型。【结论】通过定点突变, 确定了对NahK催化活性有影响的4个位点, 并且获得了一个催化效率提高的突变体(F247Y), 为进一步对NahK进行分子改造奠定了一定基础。

**关键词:** N-乙酰氨基己糖1-位激酶, 活性位点, 长双歧杆菌, DNS法, NADH偶联的微孔板分光光度法

N-乙酰氨基葡萄糖(N-acetylglucosamine, GlcNAc)和N-乙酰氨基半乳糖(N-acetylgalactosamine, GalNAc)是生物体内常见的两种乙酰氨基糖, 它们在生物体内参与细胞壁骨架、糖胺聚糖、糖蛋白等的构成<sup>[1-4]</sup>, 并进而参与很多重要的信号识别过程<sup>[5-6]</sup>。合成含有GlcNAc/GalNAc的化合物并研究它们的生物学功能将有助于揭示这些含糖化合物的功能。由于糖类化合物的结构具有多个羟

基, 反应专一性强且效率高的酶法合成成为合成该类化合物的首选方法。研究发现, 长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)的一种N-乙酰氨基己糖1-位激酶(N-acetylhexosamine 1-kinase, NahK)能将GlcNAc和GalNAc直接磷酸化成为GlcNAc-1-磷酸(GlcNAc-1-P)/GalNAc-1-磷酸(GalNAc-1-P)<sup>[7]</sup>且效率很高, 再配合来源于大肠杆菌(*Escherichia coli*)的UDP-GlcNAc焦磷酸化酶(GlmU)或来源于

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(31200605); 教育部高等学校博士学科点基金项目(20121303120006); 河北省自然科学基金项目(C2014205161); 河北师范大学科研基金项目(L2011B14)

**\*通信作者:** Tel/Fax: +86-311-80789712; E-mail: zhaobaohua@mail.hebtu.edu.cn

**#并列第一作者。**

**收稿日期:** 2015-04-10; **修回日期:** 2015-06-17; **网络出版时间:** 2015-06-23

人(*Homo sapiens*)的UDP-GalNAc焦磷酸化酶(AGX1)就可获得UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc<sup>[8-10]</sup>, 为进一步酶法合成含GlcNAc/GalNAc的化合物提供了前体化合物。此外, NahK还能将GlcNAc/GalNAc的多种非天然衍生物高效转化为相应的1-磷酸糖<sup>[11-12]</sup>, 并可被GlmU和/或AGX1进一步转化成相应的非天然糖核苷酸<sup>[8-9]</sup>, 用于开发具有新的药物活性的化合物和研究糖类合成酶的机理。因此, NahK作为一种工具酶对含GlcNAc/GalNAc化合物的相关研究具有重要意义。

由于NahK是在GlcNAc/GalNAc等化合物的1-位进行磷酸化, 与以往报道的GlcNAc激酶(在GlcNAc的6-位磷酸化)不同, 而且其可识别结构有较多变化的底物, 因此, 研究其活性位点尤其是底物结合位点, 将有助于了解该酶的底物偏好性, 并可以指导我们对该酶定向改造, 以获得可以识别更多底物或者对底物的转化效率更高的工具酶。

本文通过定点突变并检测突变酶活性的方法, 研究了4个位点对NahK催化活性的影响。在研究开始的阶段, 由于该酶的晶体结构没有被报道, 而且其氨基酸序列与其他已报道了晶体结构的蛋白相似度很低, 所以我们根据NCBI网站对该酶的分析, 选定了网站上预测的与糖底物结合的His31、Asp208和Phe247三个位点进行突变研究。后来, 网站将His31位点调整为Ile24, 我们又进行了Ile24位点的突变研究。研究获得了比野生型酶催化效率更高的突变体酶, 为进一步探索改造出能识别更多非天然糖底物或转化效率更高的酶用于天然及非天然糖核苷酸的合成奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 大肠杆菌*Escherichia coli* BL21 (DE3)购自Novagen公司。含有长双歧杆菌(*B. longum*) JCM1217的N-乙酰氨基己糖1-位激酶

基因nahK (C端融合有His<sub>6</sub>标签)的质粒<sup>[11]</sup>由本实验室保存。

**1.1.2 试剂:** 点突变试剂盒Fast Mutagenesis System购自北京全式金生物技术有限公司; BCA法蛋白定量试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司; 镍柱填料Ni-NTA agarose购自Qiagen公司; 超滤管Amicon Ultra (截留分子量10000 kDa)购自Millipore公司; N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)、N-乙酰氨基半乳糖(GalNAc)、腺苷三磷酸(ATP)、磷酸烯醇式丙酮酸、丙酮酸激酶、乳酸脱氢酶购自Sigma-Aldrich公司。其他所有化学试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.2 突变位点的选择

在本研究开始的阶段, 没有NahK蛋白的晶体结构报道, 而且其氨基酸序列与已经报道了晶体结构的蛋白的氨基酸序列相似度很低, 通过序列比对, 没有获得有效的信息。而NCBI Protein数据库中的NahK条目(Accession Number: BAF73925)里注释出31、208和247位点为底物结合位点[化学结合](substrate binding site [chemical binding]), 因此, 本研究就选定H31、D208和F247三个氨基酸进行突变并分析突变体酶的催化活性。在研究过程中, 由于NCBI Protein数据库对NahK条目的底物结合位点进行了调整(将31调整为24), 因此, 我们又补充选择I24作为突变位点, 研究其定点突变后酶活性的改变情况。

### 1.3 NahK His31、Asp208、Phe247和 Ile24氨基酸的突变

氨基酸的定点突变按照点突变试剂盒Fast Mutagenesis System的说明书进行。根据各突变位点的需要设计引物(表1), 以质粒pET22b-nahK作为模板, 进行定点突变。通过基因序列测定, 确定突变成功。再将包含各突变(H31A/V, D208A/N/E, F247A/Y, I24A/L/V)的重组质粒转化到大肠杆菌BL21 (DE3)中, 获得突变体酶的表达菌株。

表1. 定点突变引物序列

Table 1. Primers for the site-directed mutagenesis

Primers	Sequences (5'→3') *
H31A/V	F: CTTACGGAGACGGCGYCATCAACACC; R: <b>R</b> CGCCGTCTCCGTAAGGTTCGATACCGG
D208A	F: GCGTGACCCACAATG <b>C</b> CACCAAGCTC; R: <b>G</b> CATTGTGGGTACGCGCAGCGGAATCG
D208N	F: GCGTGACCCACAAT <b>A</b> ACCAAGCTC; R: <b>T</b> ATTGTGGGTACGCGCAGCGGAATCG
D208E	F: GCGTGACCCACAATG <b>A</b> ACCAAGCTC; R: <b>C</b> TCATTGTGGGTACGCGCAGCGGAATCG
F247A	F: GATTCCATACGC <b>G</b> CTGGTGCGTCC; R: <b>G</b> CGCGTATGGAATCGCCGAAGTCGA
F247Y	F: GATTCCATACGCT <b>A</b> TGGTGCGTCC; R: <b>T</b> AGCGTATGGAATCGCCGAAGTCG
I24A	F: TGCCGTGACCGGT <b>G</b> CCGAACCTTAC; R: <b>G</b> CACCGGTACGCGCACCTTCCAGCG
I24L	F: GTGCCGTGACCGGT <b>C</b> TCGAACCTTAC; R: <b>G</b> CACCGGTACGCGCACCTTCCAGCGC
I24V	F: GTGCCGTGACCGGT <b>G</b> TCGAACCTTAC; R: <b>C</b> ACCGGTACGCGCACCTTCCAGCGC

\* Bold underlined letters represent mutated sites of *nahK*.

Degenerate base: Y=C, T, R=G, A.

#### 1.4 NahK野生型酶和突变体酶的过表达和纯化

NahK野生型(wild type, WT)及突变体酶均按照以下方法表达和纯化。将含有各重组质粒的大肠杆菌BL21 (DE3) 重组菌株分别接种至LB液体培养基(含100 µg/mL氨苄青霉素), 37 °C振荡培养过夜。次日将培养液按体积比1: 100的比例接种至新鲜LB液体培养基(含100 µg/mL氨苄青霉素)中, 37 °C振荡培养至OD<sub>600</sub>达到0.7, 向培养液中添加IPTG (终浓度为0.1 mmol/L), 在16 °C继续振荡培养20 h, 诱导蛋白表达。

蛋白表达结束后, 以4000×g离心10 min, 收集菌体。用20 mmol/L 磷酸钠盐缓冲液(pH 7.4)重悬菌体, 于冰上用超声波破碎菌体。将破碎菌体后的液体在4 °C以17000×g离心30 min, 然后将所得上清液中的目的蛋白用镍柱亲和层析法进行纯化。首先用结合缓冲液(20 mmol/L磷酸钠盐缓冲液, pH 7.4, 0.1 mol/L NaCl和10 mmol/L咪唑)平衡镍柱; 然后将破碎菌体后的上清液上样至平衡好的镍柱; 冰上孵育1 h后用洗涤缓冲液(20 mmol/L磷酸钠盐缓冲液, pH 7.4, 0.1 mol/L NaCl和10 mmol/L咪唑)洗涤3次, 最后用洗脱缓冲液

(20 mmol/L磷酸钠盐缓冲液, pH 7.4, 0.1 mol/L NaCl和500 mmol/L咪唑)洗脱目的蛋白。用超滤管对收集到的目的蛋白溶液更换缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5)并浓缩。纯化得到的酶蛋白于-20 °C保存于50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 20%甘油溶液中备用。蛋白的纯度通过SDS-PAGE检测。蛋白浓度利用BCA (bicinchoninic acid)法测定, 以牛血清白蛋白作为标准品。

#### 1.5 酶活性的测定

NahK WT及突变体的酶活性采用根据参考文献[13]修改的DNS法检测。反应混合物含200 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 4 mmol/L GlcNAc, 4 mmol/L ATP和酶, 总体积50 µL, 在37 °C孵育60 min。将反应混合物沸水浴5 min终止反应, 然后向该混合物中加入200 µL DNS试剂<sup>[14]</sup>, 再煮5 min。待混合物冷却至室温, 用BioTek Epoch<sup>TM</sup>微孔板分光光度计在575 nm测吸光度。利用含有系列浓度的GlcNAc (0、1、2、3、4和5 mmol/L)和5 mmol/L ATP的Tris-HCl缓冲液(pH 7.5), 按DNS法做标准曲线。

#### 1.6 最适pH的测定

不同pH条件下的酶活性采用NADH偶联的微孔板分光光度法<sup>[15]</sup>测定。反应体系为200 µL, 含有200 mmol/L缓冲液(pH 6.0–9.0), 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L GlcNAc, 1 mmol/L ATP, 2 mmol/L磷酸烯醇式丙酮酸, 2 units丙酮酸激酶, 20 units乳酸脱氢酶, 0.4 mmol/L NADH和0.25 µmol/L酶(NahK WT或其突变体)。所用缓冲液为: MES, pH 6.0–7.0; Tris-HCl, pH 7.0–9.0。先将除酶以外的其他成分混匀, 在37 °C孵育2 min, 然后加入酶作为反应开始, 在37 °C反应10 min, 向每个反应体系中加入50 µL EDTA (200 mmol/L)终止反应。每个反应体系做2个平行。测定340 nm的吸光度, 根据吸光度的变化计算酶活性。标准曲线通过测定不同浓度的NADH在340 nm的吸光度绘制。

## 1.7 $Mg^{2+}$ 浓度对酶催化活性影响的测定

$Mg^{2+}$  浓度对酶催化活性的影响也采用 NADH 偶联的微孔板分光光度法测定。反应体系与测定最适 pH 的体系相似。所用缓冲液的 pH 值为待测酶的最适 pH,  $MgCl_2$  浓度为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 和 20.0 mmol/L。每个反应体系 2 个平行。根据测得的 340 nm 吸光度的减少计算酶活性。

## 1.8 NahK 及其突变体的反应动力学参数测定

酶促反应动力学参数通过 NADH 偶联的微孔板分光光度法测定。在 200  $\mu$ L 的反应体系中(与测定最适 pH 的体系相似), pH 值为待测酶蛋白的最适 pH,  $MgCl_2$  浓度为待测酶蛋白的最适  $Mg^{2+}$  浓度。测定糖底物的动力学参数时, 反应液中 ATP 浓度固定为 1 mmol/L, GlcNAc 或 GalNAc 浓度分别为 0.3、0.4、0.5、0.7、0.9、1.0 和 1.5 mmol/L; 测定 ATP 的动力学参数时, 反应液中 GlcNAc 或 GalNAc 浓度固定为 1 mmol/L, ATP 的浓度改变(分别为 0.3、0.4、0.5、0.7、0.9、1.0 和 1.5 mmol/L)。反应过程同前, 每个反应体系做 2 个平行。记录 340 nm 处吸光度的减少值。根据 Michaelis-Menten 方程, 利用 GraphPad 5.0 计算表观动力学参数。

# 2 结果和分析

## 2.1 NahK 野生型和突变体酶的获得

通过定点突变实验并经过测序验证, 共得到 10 个含有单点突变的 NahK 突变体酶(H31A/V, D208A/N/E, F247A/Y, I24A/L/V)表达菌株。加上野生型(WT), 11 种表达菌株均以 0.1 mmol/L IPTG 在 16  $^{\circ}$ C 振荡培养 20 h 诱导蛋白表达。通过镍柱亲和层析法, NahK WT 及突变体的每升大肠杆菌培养液中可纯化出至少 120 mg 酶蛋白。通过 SDS-PAGE 分析, 所有纯化所得蛋白的分子量均与带有 C 端 His<sub>6</sub> 标签的目的蛋白的计算分子量一致。

## 2.2 NahK 野生型及突变体的活性测定

在 DNS 法中, 检测物为反应体系中未反应的 GlcNAc。由 NahK WT 或突变体催化反应 60 min 后, GlcNAc 的转化率可由 GlcNAc 的减少量计算得出(表 2)。经过 60 min 的催化, 突变体 D208A、D208N、D208E 和 I24A 对 GlcNAc 的转化率低于 15%, 其 1-位激酶活性很低。因此, 对这四种突变体没有进一步分析最适 pH、最适  $Mg^{2+}$  和动力学参数。突变体 D208A/N/E 分别将侧链带负电荷的 Asp208 突变为侧链不带电荷的 Ala 和 Asn 以及侧链同样带负电荷但变大的 Glu, 侧链电荷的丧失或者侧链基团大小的变化均导致酶活性严重降低(分别为 7%、7% 和 12%), 表明 Asp208 对 NahK 正常行使催化功能很重要。I24A 将侧链非极性且基团较大的 Ile24 突变为侧链非极性但基团较小的 Ala, 导致突变体酶的催化功能严重受损(GlcNAc 转化率仅为 10%), 而突变为与 Ile 侧链基团的极性和大小相近的 Leu 或 Val 时, GlcNAc 转化率(分别为 90% 和 86%)与 WT (88%) 接近, 这说明 I24A 活性的丧失主要是由侧链基团变小造成的。

表 2. NahK WT 或突变体催化反应 60 min 时的 GlcNAc 转化率

Table 2. The percentage conversion of GlcNAc after 60 min reaction catalyzed by NahK WT or mutants

Enzymes	Percentage conversion of GlcNAc/%
WT	88
H31A	91
H31V	90
D208A	7
D208N	7
D208E	12
F247A	91
F247Y	90
I24A	10
I24L	90
I24V	86

## 2.3 最适pH的测定

在NahK催化反应过程中,消耗的GlcNAc摩尔数与生成的ADP摩尔数相等,生成的ADP在偶联反应中被NADH氧化,再通过340 nm处吸光度值的变化来测定NADH的消耗量。由此可以计算得到GlcNAc的转化率(图1)。根据不同pH条件下反应体系所测得的GlcNAc转化率可知,WT及突变体酶活性较高的pH范围介于7.0与8.5之间,其中,WT、F247Y和I24L的最适pH为7.5, H31A、H31V、F247A和I24V的最适pH变为7.0。pH低于7.0或高于8.5时,活性下降。酶蛋白在各自的最适pH条件下反应10 min,突变体F247Y所在反应体系(pH 7.5)的GlcNAc转化率最高,达到80%,其次是F247A (pH 7.0), GlcNAc转化率为68%,均高于WT (pH 7.5, GlcNAc转化率65%)。

## 2.4 $Mg^{2+}$ 浓度对酶的催化活性的影响的测定

利用NADH偶联的微孔板分光光度法,  $Mg^{2+}$ 浓度对酶的催化活性的影响由反应体系中GlcNAc的转化率体现(图2)。由图可知,在各酶的最适pH条件下, WT、H31V、F247Y、I24L和I24V的最适  $Mg^{2+}$  浓度为5 mmol/L, H31A和F247A的最适  $Mg^{2+}$  浓度增大为10 mmol/L。当  $Mg^{2+}$  浓度低于最适条件时, GlcNAc转化率降低明

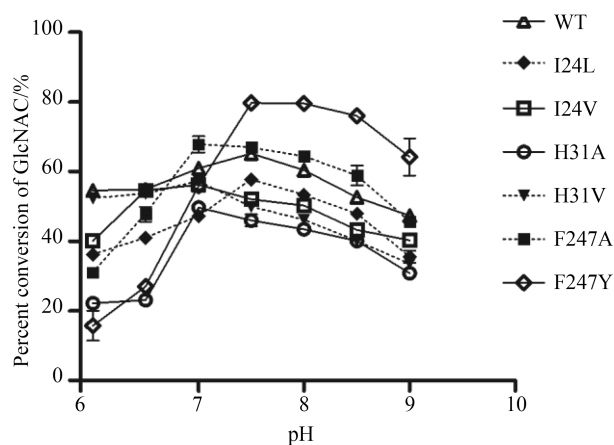


图1. NahK及其突变体在不同pH条件下催化反应的GlcNAc转化率

Figure 1. Percentage conversion of GlcNAc under

显, 像  $Mg^{2+}$  浓度为2 mmol/L时, GlcNAc转化率约为  $Mg^{2+}$  浓度为5 mmol/L时的70%; 当  $Mg^{2+}$  浓度高于最适条件时, GlcNAc转化率略有降低。酶蛋白在各自的最适  $Mg^{2+}$  浓度条件下反应10 min, 突变体F247Y所在反应体系(5 mmol/L  $Mg^{2+}$ )的GlcNAc转化率最高, 达到84%, 其次是H31V (5 mmol/L  $Mg^{2+}$ ), GlcNAc转化率为71%, 均高于WT (5 mmol/L  $Mg^{2+}$ ), GlcNAc转化率66%。

## 2.5 NahK及其突变体的反应动力学参数测定

酶对底物亲和力大小用  $K_m$  表示( $K_m$  GlcNAc、 $K_m$  GalNAc或 $K_m$  ATP), 酶对底物的催化常数用  $k_{cat}$  表示( $k_{cat}$  GlcNAc、 $k_{cat}$  GalNAc或 $k_{cat}$  ATP), 酶对底物的催化效率用  $k_{cat}/K_m$  表示( $k_{cat}/K_m$  GlcNAc、 $k_{cat}/K_m$  GalNAc或 $k_{cat}/K_m$  ATP)。NahK及其突变体的表观反应动力学参数见表3。数据表明, 突变体对不同底物的催化效率不同。当ATP存在时, WT对GlcNAc的催化效率 [ $k_{cat}/K_m = 10$  L/(s·mmol)] 比对GalNAc的催化效率 [ $k_{cat}/K_m = 6.8$  L/(s·mmol)] 高47%。与WT不同, 突变体I24V的  $K_m$  GlcNAc 和  $K_m$  GalNAc 相同, 而  $k_{cat}$  GlcNAc 比  $k_{cat}$  GalNAc 小, 因此,  $k_{cat}/K_m$  GlcNAc 比  $k_{cat}/K_m$  GalNAc 小, 其对GalNAc的催化效率高于GlcNAc。类似地, F247Y的  $k_{cat}/K_m$  GlcNAc 也小于其  $k_{cat}/K_m$  GalNAc, 其对GalNAc比对GlcNAc的效率更高。而其他突变体均与WT相同, 尽管各酶的  $K_m$  GlcNAc 值比  $K_m$  GalNAc 值略大, 但由于它们的  $k_{cat}$  GlcNAc 值比  $k_{cat}$  GalNAc 值大, 因此, 各酶的  $k_{cat}/K_m$  GlcNAc 值比其  $k_{cat}/K_m$  GalNAc 值大, 即对GlcNAc的催化效率高于对GalNAc的催化效率。

31位的突变体H31A和H31V将侧链较大的带极性的His分别突变为侧链较小的不带极性的Ala和侧链较大的不带极性的Val, 两个突变体的  $K_m$  GlcNAc 和  $K_m$  GalNAc 均高于WT, 而其  $k_{cat}/K_m$  GlcNAc 和  $k_{cat}/K_m$  GalNAc 值均低于WT, 表明His31可能在酶与糖底物(GlcNAc或GalNAc)的结合中起一定作用, 突变后, 酶与糖底物的结合受到了干扰, 进

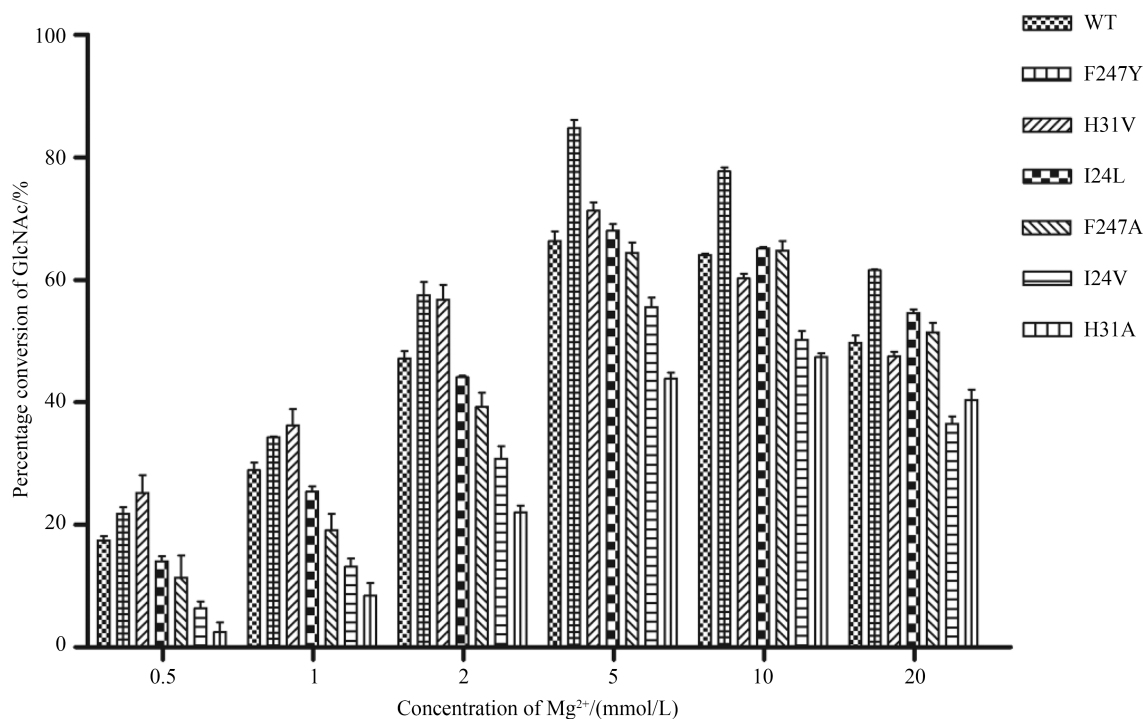


图2.  $Mg^{2+}$  浓度对NahK及其突变体的催化活性的影响

Figure 2. Effects of  $Mg^{2+}$  concentration on the catalytic activities of NahK and its mutants.

而阻碍了酶对GlcNAc/GalNAc的1-位磷酸化。然而,除了H31A的 $k_{cat}/K_m ATP$  (另一底物为GlcNAc时)比WT略低, H31A和H31V对ATP的催化效率在整体上比WT有所提高。

24位的突变体I24L和I24V将Ile分别突变为其同分异构体Leu和侧链比Ile略小但极性相似的Val。与31位的突变体类似, I24L和I24V的 $K_m GlcNAc$ 和 $K_m GalNAc$ 也都比WT高, 暗示Ile24也对酶与糖底物(GlcNAc或GalNAc)的结合起作用。突变后, 只有I24V的 $k_{cat}/K_m GalNAc$ 比WT略高, I24L的 $k_{cat}/K_m GlcNAc$ 和 $k_{cat}/K_m GalNAc$ 值以及I24V的 $k_{cat}/K_m GlcNAc$ 值均低于WT, 表明24位的突变总体上阻碍了酶对GlcNAc/GalNAc的1-位磷酸化。另一方面, 无论糖底物是GlcNAc还是GalNAc, I24L和I24V对ATP的催化效率都比WT高。推测Ile24主要通过影响糖底物与NahK的结合来影响催化效率。

在突变体F247A中, Phe247的苯环被去掉。动力学参数测定结果显示, 该突变体的 $K_m GlcNAc$ 和 $K_m GalNAc$ 均与WT相同, 而无论糖底物是GlcNAc还是GalNAc, 其 $K_m ATP$ 均大于WT, 推测Phe247的苯环在酶与GlcNAc/GalNAc结合时并不起主要作用, 但会影响酶与ATP的结合; F247A的 $k_{cat}/K_m GlcNAc$ 和 $k_{cat}/K_m GalNAc$ 值均略低于WT, 而且其 $k_{cat}/K_m ATP$  (另一底物为GlcNAc或GalNAc)远小于WT, 表明苯环的去除影响了NahK行使催化功能。在突变体F247Y中, 保留了其苯环结构, 并且在苯环上增加了酚羟基。实验测得, F247Y的 $K_m GlcNAc$ 、 $K_m GalNAc$ 和 $K_m ATP$ 值均比WT低, 并且其 $k_{cat}/K_m GlcNAc$ 、 $k_{cat}/K_m GalNAc$ 和 $k_{cat}/K_m ATP$ 值均比WT高, 即该酶对GlcNAc、GalNAc和ATP的催化效率均高于WT, 推测是由于苯丙氨酸突变为酪氨酸时, 氨基酸侧链上多出的酚羟基更有助于酶与底物GlcNAc/GalNAc及ATP结合, 促进了磷酸化反应的进行。

表3. NahK WT及其突变体的表观反应动力学参数  
Table 3. The apparent kinetic parameters of NahK WT and mutants

Substrates	Parameters	WT	H31A	H31V	F247A	F247Y	I24L	I24V
GlcNAc	$K_m$ (mmol/L)	0.26±0.02	0.73±0.03	0.60±0.04	0.26±0.03	0.19±0.03	0.29±0.04	0.33±0.02
	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	2.64±0.06	3.53±0.07	4.29±0.12	2.43±0.08	2.26±0.07	2.84±0.11	1.61±0.03
	$k_{cat}/K_m$ [L/(s·mmol)]	10.0	4.8	7.1	9.4	12.0	9.8	4.9
	$k_{cat}/K_m$ ratio	1.00	0.48	0.71	0.94	1.20	0.98	0.49
ATP <sup>a</sup>	$K_m$ (mmol/L)	0.09±0.01	0.12±0.02	0.04±0.002	0.32±0.10	0.03±0.003	0.09±0.01	0.07±0.01
	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	1.57±0.01	1.85±0.04	2.12±0.01	2.16±0.20	3.77±0.02	1.85±0.02	2.30±0.04
	$k_{cat}/K_m$ [L/(s·mmol)]	17.4	15.2	48.0	6.7	121.1	20.5	33.1
	$k_{cat}/K_m$ ratio	1.00	0.87	2.80	0.39	7.00	1.20	1.90
GalNAc	$K_m$ (mmol/L)	0.18±0.03	0.48±0.03	0.30±0.03	0.18±0.02	0.12±0.01	0.23±0.01	0.33±0.06
	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	1.20±0.04	1.09±0.02	1.51±0.04	1.18±0.03	1.53±0.03	1.16±0.02	2.53±0.13
	$k_{cat}/K_m$ [L/(s·mmol)]	6.8	2.3	5.0	6.7	12.3	5.0	7.6
	$k_{cat}/K_m$ ratio	1.00	0.34	0.74	0.99	1.80	0.74	1.10
ATP <sup>b</sup>	$K_m$ (mmol/L)	0.10±0.01	0.060±0.007	0.15±0.02	0.29±0.06	0.060±0.005	0.13±0.02	0.20±0.03
	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	1.04±0.02	0.980±0.009	1.69±0.04	0.92±0.06	2.09±0.02	1.44±0.03	2.44±0.08
	$k_{cat}/K_m$ [L/(s·mmol)]	10.7	16.7	11.3	3.2	37.0	11.2	12.2
	$k_{cat}/K_m$ ratio	1.0	1.6	1.1	0.3	3.5	1.0	1.1

<sup>a</sup> The other substrate is GlcNAc; <sup>b</sup> The other substrate is GalNAc.

3 讨论

在此研究进行过程中，NahK的晶体结构被Wang等<sup>[16]</sup>和Sato等<sup>[17]</sup>报道。结合晶体结构，我们对本研究的结果做了进一步分析。

通过分析NahK的二级结构<sup>[16]</sup>，本研究所选择的H31、D208、F247和I24四个突变位点分别位于NahK的β1片层与β2片层之间的无规则卷曲、β7片层与β8片层之间的无规则卷曲、α7螺旋和β1片层中。

根据晶体结构，Asp208侧链中的羧基与糖底物(GlcNAc/GalNAc)的1-位羟基和2-位的氨甲酰基形成氢键(图3-A)，直接参与糖底物与酶的结合，并很可能作为碱性基团催化反应<sup>[16-17]</sup>。因此，当突变造成羧基的缺失后，D208A/N与糖底物结合受到阻碍；保留羧基但侧链变长时，由于空间位

阻，D208E与糖底物的结合也受到影响，造成Asp208的3种突变体活性均远低于WT，印证了Asp208对NahK的催化活性起非常重要的作用。

在晶体结构的报道中，His31的主链氨基与ATP的γ-磷酸基团之间有氢键作用(图3-A)<sup>[16]</sup>。而NCBI网站上最初推测His31与糖底物结合相关，后来又将其改为Ile24。在本研究的结果中，反应时间较长(60 min)时，突变体H31A和H31V的GlcNAc转化率(分别为91%和90%)比WT (88%)略高。糖底物为GlcNAc或GalNAc时，尽管H31A和H31V对ATP的亲和力高于或低于WT，但二者对ATP的催化效率在多数情况下高于WT (仅H31A在GlcNAc存在时比WT略低)。我们分析，这是由于His31本身是通过主链的氨基与ATP形成氢键，即使突变为其他氨基酸，主链的氨基仍然存在，仍然可以结合ATP，甚至在氨基酸由侧链有极性的



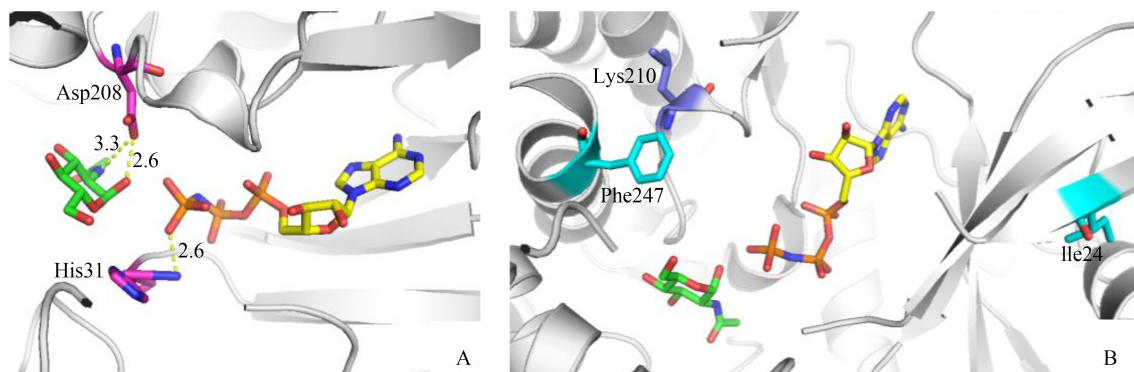


图3. NahK-GlcNAc-AMPPNP复合物晶体(PDB编号: 4OCK)<sup>[16]</sup>中, 所选突变位点与GlcNAc和AMPPNP的位置关系

Figure 3. The positions of selected mutation sites and GlcNAc and AMPPNP in crystal structure of NahK-GlcNAc-AMPPNP complex (PDB code: 4OCK). A: Asp208 and His31 are shown as magenta sticks. The hydrogen bonds formed between residues and GlcNAc or AMPPNP are shown as yellow broken lines; B: Phe247 and Ile24 are shown as cyan sticks, and Lys210 which is near Phe247 is shown as slate sticks. GlcNAc and AMPPNP are shown as green and yellow sticks, respectively. Figures were generated using PyMOL (<http://www.pymol.org>).

His变为侧链非极性的Val时,  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m ATP}}$ 值反而增大。而H31A和H31V对GlcNAc和GalNAc的亲力和催化效率均低于WT, 推测His31的存在仍然有助于酶与GlcNAc/GalNAc的结合。

Ile24位于NahK N-端结构域的5个反平行 $\beta$ -片层( $\beta 1$ - $\beta 5$ )中的 $\beta 1$ 当中(PDB编号: 4OCK)<sup>[16]</sup>, 离底物(GlcNAc/GalNAc和ATP)结合区域较远(图3-B)。但是我们发现突变体I24A的催化活性严重降低, 而突变为与Ile侧链结构相似的Leu或Val时, GlcNAc转化率与WT接近。突变体I24L和I24V对糖底物的亲和力低于WT, 催化效率低于或者接近WT, 而二者对ATP的催化效率比WT高, 由此推测, 尽管Ile24距离底物结合区域较远, 但它仍然会影响到糖底物与酶的结合并影响酶的催化效率。

Phe247位于C-端结构域的核心亚结构域(core subdomain)的 $\alpha 7$ 中(PDB编号: 4OCK)<sup>[16]</sup>, 与GlcNAc/GalNAc并没有直接形成氢键相互作用, 但是Phe247距离与GlcNAc/GalNAc形成氢键的Lys210 (位于核心亚结构域的 $\eta 2$ 中)非常近(图3-B)。在本实验中, 反应60 min时, F247A和F247Y两个突变体对GlcNAc的转化率(分别为

91%和90%)均高于WT (88%)。F247A对糖底物的亲和力与WT相同, 但催化活性比WT略低, 而且对ATP的亲力和催化活性均低于WT; 然而, F247Y对糖底物和ATP的亲力和催化效率均高于WT。

在本实验中, 我们通过定点突变初步探索了4个位点对NahK催化活性的影响, 确定了Asp208是酶具有活性的关键位点, His31、Ile24和Phe247对酶活有一定程度的影响, 并获得了1个催化效率比WT高的突变体(F247Y)。本实验为我们后续对NahK的改造工作奠定了一定基础。在此基础上, 我们可以根据此酶的晶体结构及对其反应机理的推测来设计突变, 探索改造获得一些可以磷酸化更多种非天然糖底物的突变酶, 或提高酶的转化效率, 用于天然及非天然糖核苷酸的合成。

## 参考文献

- [1] van Heijenoort J. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology*, 2001, 11(3): 25R-36R.



- [ 2 ] Salmivirta M, Lidholt K, Lindahl U. Heparan sulfate: a piece of information. *The FASEB Journal*, 1996, 10(11): 1270–1279.
- [ 3 ] Lindahl U, Hook M. Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. *Annual Review of Biochemistry*, 1978, 47: 385–417.
- [ 4 ] Carraway KL, Hull SR. Cell surface mucin-type glycoproteins and mucin-like domains. *Glycobiology*, 1991, 1(2): 131–138.
- [ 5 ] Hart GW, Housley MP, Slawson C. Cycling of O-linked  $\beta$ -*N*-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature*, 2007, 446(7139): 1017–1022.
- [ 6 ] Hakomori S. Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annual Review of Biochemistry*, 1981, 50: 733–764.
- [ 7 ] Nishimoto M, Kitaoka M. Identification of *N*-acetylhexosamine 1-kinase in the complete lacto-*N*-biose I/galacto-*N*-biose metabolic pathway in *Bifidobacterium longum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(20): 6444–6449.
- [ 8 ] Guan WY, Cai L, Fang JQ, Wu BL, Wang PG. Enzymatic synthesis of UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc analogs using *N*-acetylglucosamine 1-phosphate uridyltransferase (GlmU). *Chemical Communications*, 2009, (45): 6976–6978.
- [ 9 ] Guan WY, Cai L, Wang PG. Highly efficient synthesis of UDP-GalNAc/GlcNAc analogues with promiscuous recombinant human UDP-GalNAc pyrophosphorylase AGX1. *Chemistry – A European Journal*, 2010, 16(45): 13343–13345.
- [ 10 ] Zhao GH, Guan WY, Cai L, Wang PG. Enzymatic route to preparative-scale synthesis of UDP-GlcNAc/GalNAc, their analogues and GDP-fucose. *Nature Protocols*, 2010, 5(4): 636–646.
- [ 11 ] Cai L, Guan WY, Kitaoka M, Shen J, Xia CF, Chen WL, Wang PG. A chemoenzymatic route to *N*-acetylglucosamine-1-phosphate analogues: substrate specificity investigations of *N*-acetylhexosamine 1-kinase. *Chemical Communications*, 2009, (20): 2944–2946.
- [ 12 ] Cai L, Guan WY, Wang WJ, Zhao W, Kitaoka M, Shen J, O’Neil C, Wang PG. Substrate specificity of *N*-acetylhexosamine kinase towards *N*-acetylgalactosamine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2009, 19(18): 5433–5435.
- [ 13 ] Yang J, Fu X, Jia Q, Shen J, Biggins JB, Jiang JQ, Zhao JJ, Schmidt JJ, Wang PG, Thorson JS. Studies on the substrate specificity of *Escherichia coli* galactokinase. *Organic Letters*, 2003, 5(13): 2223–2226.
- [ 14 ] 邹洋. 糖核苷酸的酶法合成与唾液酸糖肽的分离制备. 山东大学硕士学位论文, 2012.
- [ 15 ] Martinez J, Nguyen LD, Hinderlich S, Zimmer R, Tauberger E, Reutter W, Saenger W, Fan H, Moniot S. Crystal structures of *N*-acetylmannosamine kinase provide insights into enzyme activity and inhibition. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(17): 13656–13665.
- [ 16 ] Wang KC, Lyu SY, Liu YC, Chang CY, Wu CJ, Li TL. Insights into the binding specificity and catalytic mechanism of *N*-acetylhexosamine 1-phosphate kinases through multiple reaction complexes. *Acta Crystallographica Section D*, 2014, 70(Pt 5): 1401–1410.
- [ 17 ] Sato M, Arakawa T, Nam YW, Nishimoto M, Kitaoka M, Fushinobu S. Open-close structural change upon ligand binding and two magnesium ions required for the catalysis of *N*-acetylhexosamine 1-kinase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2015, 1854(5): 333–340.

# Active sites of *N*-acetylhexosamine 1-kinase from *Bifidobacterium longum*

Wanyi Guan<sup>#</sup>, Jing Bai<sup>#</sup>, Tianhui Zhou, Baohua Zhao<sup>\*</sup>

College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, Hebei Province, China

**Abstract:** [Objective] To study the active sites of *N*-acetylhexosamine 1-kinase (NahK) from *Bifidobacterium longum* JCM1217. [Methods] We obtained expression strains of 10 single-mutants at 4 sites of NahK by site-directed mutagenesis, and expressed and purified both wild-type (WT) and mutant enzymes. Then, their optimum pH and optimum concentration of Mg<sup>2+</sup> were determined by DNS assay and NADH-coupled microplate photometric assay, and their kinetic parameters were measured. [Results] Four mutants (D208A, D208N, D208E and I24A) lost most part of the catalytic activity. The optimum pH of mutants H31A, H31V, F247A and I24V switched from pH 7.5 (for WT) to pH 7.0, and the optimum concentration of Mg<sup>2+</sup> of mutants H31A and F247A increased to 10 mmol/L from 5 mmol/L (for WT). The kinetic parameters of WT and mutants indicate that mutant F247Y had higher enzymatic activity toward GlcNAc, GalNAc and ATP than WT. [Conclusion] The key amino acids that affect the catalytic activity of NahK were determined by site-directed mutagenesis, and together with the mutant that has higher catalytic efficiency, this has laid a foundation for further modification and evolution of NahK.

**Keywords:** *N*-acetylhexosamine 1-kinase, active site, *Bifidobacterium longum*, DNS assay, NADH-coupled microplate photometric assay

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31200605), by the Doctoral Fund of Ministry of Education of China (20121303120006), by the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2014205161) and by the Research Funding of Hebei Normal University (L2011B14)

<sup>#</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel/Fax: +86-311-80789712; E-mail: zhaobaohua@mail.hebtu.edu.cn

Received: 10 April 2015; Revised: 17 June 2015; Published online: 23 June 2015