



腾冲嗜热厌氧菌丙氨酸消旋酶底物通道氨基酸位点的功能

何广正¹, 韩卿卿¹, 徐书景^{1,2}, 赵宝华¹, 鞠建松^{1*}

¹河北师范大学生命科学学院, 河北 石家庄 050024

²河北师范大学旅游学院, 河北 石家庄 050024

摘要:【目的】通过定点突变探究腾冲嗜热厌氧菌 MB4 中生物合成型丙氨酸消旋酶 TtAlr 底物通道内氨基酸位点 A172 和 S173 的功能。【方法】利用定点突变 PCR 技术构建突变体, 通过亲和层析法纯化酶蛋白, 采用 D-氨基酸氧化酶偶联法检测各突变蛋白的活性及其稳定性。【结果】通过定点突变 PCR 成功得到 8 个突变体, 酶学特性分析发现, A172 位点突变为丝氨酸(S)后酶蛋白的相对活性有所提升, 但含有该位点突变的酶蛋白稳定性均大幅下降; S173 位点突变为天门冬氨酸(D)后导致突变体蛋白的最适反应温度提升了 15 °C, 半衰期大幅延长, 但相对活性明显下降。【结论】丙氨酸消旋酶 TtAlr 底物通道内 A172 和 S173 位点均是影响酶蛋白催化活性和稳定性的关键位点。

关键词: 丙氨酸消旋酶, 底物通道, 保守氨基酸位点, 定点突变, 酶学特性

丙氨酸消旋酶(Alanine racemase, Alr, EC 5.1.1.1)是以 Pyridoxal 5'-phosphate (PLP)为辅酶催化 L-丙氨酸和 D-丙氨酸旋光结构互换的一类异构酶^[1]。丙氨酸消旋酶主要分布于原核生物中, 其产物 D-丙氨酸参与细菌的生长代谢以及细菌孢子的形成和萌发^[2-3], 且 D-丙氨酸是细胞壁肽聚糖层的重要组成部分^[4-5], 以 D-丙氨酰-D-丙氨酸二肽的形式参与细胞壁肽聚糖的形成^[6], 因此, 对于原核生物来说丙氨酸消旋酶是维持细菌生命活动所必需的酶蛋白之一^[7-9]。由于哺乳动物细胞中不存在

丙氨酸消旋酶, 因此, 以丙氨酸消旋酶为靶标, 基于其分子机制寻找新型抗菌药物^[10-11], 从而阻止细菌细胞壁形成, 使细胞裂解死亡^[6], 正成为抗生素药物研发的新热点而受到国内外广泛关注^[3, 10-11]。

D-丙氨酸在食品、化妆品和医药等行业应用较为广泛^[12]。在食品方面, D-丙氨酸主要作为甜味剂和增味剂, 改善食品甜度及风味; 在化妆品方面, 作为主要的保湿因子, 可替代传统的油脂类保湿剂, 消除化妆品异味, 提高质量; 在医药方面, D-丙氨酸是维生素 B₆的前体, 可用于 VB₆。

基金项目: 河北省自然科学基金(C2015205212, C2016205130); 河北省高等学校科技技术研究项目(ZD2017047); 河北师范大学研究生创新资助项目(sj2016013)

*通信作者。Tel: +86-311-80787573; Fax: +86-311-80789794; E-mail: jujiansong@126.com

收稿日期: 2017-08-31; 修回日期: 2017-10-30; 网络出版日期: 2017-11-14

和抗生素等药物的合成和生产^[12]。目前工业生产 D-丙氨酸的方法较多, 不过, 由于化学合成法的产品产率和光学纯度比较低, 后续拆分工艺繁琐; 而酶法合成虽然方法简便易行, 污染排放少, 但筛选或改造获得稳定性好、催化活性高的酶蛋白则是当前面临的主要问题。

根据文献报道, 丙氨酸消旋酶底物通道中间层和内层是由 8 个高度保守的氨基酸残基构成的^[9-11]。同源序列比对发现, 腾冲嗜热厌氧菌 (*Thermoanaerobacter tengcongensis*) MB4 中的两个丙氨酸消旋酶 TtAlr (GenBank 登录号 AAM24437) 和 TtDadX (GenBank 登录号 AAM25327) 的底物通道内分别含有两个非保守氨基酸位点 (TtAlr: S173、Q360; TtDadX: S171、H359)^[13-14]。前期研究发现, 将 TtAlr 中 Q360 位点突变为保守的酪氨酸(Y)后, 突变体 Q360Y 的表观二级常数(k_{cat}/K_m , $4.91 \text{ s}^{-1}/(\text{mmol/L})$) 约为野生型的 18 倍, 研究表明 Q360 位点可参与影响酶蛋白催化活性^[13]; 当将 TtDadX 中相同空间位置的氨基酸残基 H359 突变为酪氨酸 Y 后, 导致酶蛋白几乎丧失了活性, 进一步研究发现该位点与另一个非保守位点 S171 共同参与了酶蛋白与辅酶 PLP 的结合作用, 当 H359 突变为 Y359 后, 导致辅酶 PLP 与酶蛋白无法稳定结合, 最终导致酶蛋白催化活性丧失^[14]。从这些研究结果可以推测, 腾冲嗜热厌氧杆菌丙氨酸消旋酶底物通道中的非保守位点大都直接或间接参与了酶蛋白催化反应。本研究基于前期的研究结果, 以 TtAlr 及相应突变体为研究对象, 通过定点突变技术构建突变体, 研究其酶学特性, 探究丙氨酸消旋酶 TtAlr 底物通道内 A172 和 S173 位点的作用机理, 为定向改造获得高活性、高稳定性的 D-丙氨酸生物合成元器件奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒和试剂

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH10B 用于基因克隆, *E. coli* BL21 (DE3) 用于蛋白表达; 质粒 pET-TtAlr 及其在 360 位点的两个突变体 pET-Q360Y 和 pET-Q360H 由本实验室构建^[13]。

Pyrobest DNA polymerase、QuickCut enzyme 和 DNA marker 购自大连宝生物公司, Plasmid extraction kit 购自 Omega 公司, Ni-NTA agarose 购自 Qiagen 公司, Low molecular weight standards 购自生工生物工程(上海)股份有限公司, 4-Aminoantipyrine、N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline sodium salt (TOOS)、Peroxidase 和 D-amino acid oxidase 购自 Sigma 公司; 其他常用试剂均为分析纯。

1.2 定点突变所用引物

根据丙氨酸消旋酶 TtAlr 待突变位点及周边序列信息, 利用 Primer Premier 5 软件设计突变引物, 表 1 灰色背景所示的字母为待突变的核苷酸。引物由上海杰瑞公司合成。

1.3 突变体构建

按照 Site-directed mutagenesis kit 技术流程, 以质粒 pET-TtAlr 及相应突变质粒为模板, PCR 扩增程序为: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 4 min; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 45 s, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 7 min, 16 个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min。

表 1. 本研究所用引物

Table 1. The primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Description
A172S-F01	CATTTTGCTGCC T CATCCGAAGA	GCA→TCA
A172S-R01	TCTTCGGATGA G GGCAGCAAAATG	TGC→TGA
S173D-F01	TGCTGCCGCAG A CGAAGATGAT	TCC→GAC
S173D-R01	ATCATCTTCG T TCGCGGCAGCA	GGA→GTC

The mutated sites are grey background.

PCR 产物用限制性内切酶 *Dpn* I 37 °C 孵育酶切后, 以化学转化法将其转入 *E. coli* DH10B 感受态细胞中, 培养于 LB 固体琼脂培养基(Kana⁺)上; 随机挑取菌落, 通过菌落 PCR 法筛选阳性克隆, 并送样测序验证。

1.4 酶蛋白的表达和纯化

将质粒 pET-TtAlr 或含突变基因的质粒转入 BL21(DE3)感受态细胞中, 于 LB 液体培养基(Kana⁺)中扩培至 OD_{600} 为 0.5 左右, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 于 30 °C 诱导培养 5 h, 离心收集菌体。

将菌体重悬于细胞裂解缓冲液(50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Imidazole)中, 采用超声波破碎法破碎细胞, 4 °C 8000 r/min 离心 10 min, 将上清通过 Ni-NTA 亲和层析柱分离、纯化酶蛋白, 通过透析法去除高浓度的咪唑和 NaCl 后分装保存于 -80 °C。采用 12.5% 的 SDS-PAGE 检测蛋白表达和纯化情况, 采用 BCA protein assay kit (TaKaRa)测定蛋白浓度。

1.5 酶学特性分析

丙氨酸消旋酶的活性分析采用消旋和氧化(D-氨基酸)两步反应法进行测定^[15-16]。

消旋反应: 在 200 μL 反应体系中加入终浓度为 50 mmol/L L-丙氨酸、10 μmol/L PLP、50 mmol/L Phosphate buffer (pH 7.4)以及 20 μL 酶液, 于 37 °C 反应 10 min。加入 25 μL 2 mol/L HCl 中止反应, 随即以 25 μL 2 mol/L NaOH 中和多余的酸, 14000 r/min 4 °C 高速离心 10 min 后, 取上清待用。以相同体积的缓冲液代替酶蛋白进行消旋反应作为空白对照。

氧化反应: 在 200 μL 反应体系中加入终浓度为 200 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、0.1 mg/mL 4-Aminoantipyrine、0.1 mg/mL TOOS、2 units

Peroxidase、0.1 unit D-amino acid oxidase 以及 100 μL 消旋反应上清, 于 37 °C 孵育 20 min, 采用微孔板分光光度计(BioTek, USA)测定 OD_{550} 。一个酶活力单位(unit)定义为 1 min 内转化生成 1 μmol D-丙氨酸所需的酶量。

1.5.1 突变蛋白的相对活性: 按照丙氨酸消旋酶活性分析方法, 以 L-丙氨酸为底物对丙氨酸消旋酶 TtAlr 以及突变酶蛋白进行催化活力分析。首先确定各消旋酶蛋白的浓度, 分别在反应体系中加入同等量的消旋酶蛋白进行催化反应, 检测反应生成的产物量并判断 TtAlr 与突变消旋酶的相对催化活力。设定野生型蛋白 TtAlr 的相对活力为 100%, 比较其他几种突变消旋酶的催化活力, 以变性失活的酶蛋白作为空白对照。

1.5.2 突变蛋白的稳定性: 将丙氨酸消旋酶 TtAlr 和突变酶蛋白分别置于 Britton-Robinson 缓冲溶液 (pH 10.38)中, 65 °C 孵育不同时间, 待热处理结束, 向热处理的消旋酶中, 加入 L-丙氨酸(终浓度 50 mmol/L)和 PLP (终浓度 10 μmol/L)混合液开始消旋反应。通过测定不同热处理时间的丙氨酸消旋酶的活性, 确定各酶蛋白在 pH 10.38 (BR buffer) 65 °C 条件下的热稳定性情况。空白组以不做热处理的酶蛋白的催化活力为 100%。

2 结果和分析

2.1 同源序列比对及突变位点确定

Couñago 等通过解析来自 *Bacillus anthracis* (Ames)的丙氨酸消旋酶 Alr_{Bax} 三维结构发现, 该酶的底物通道中间层和内层由 8 个高度保守的氨基酸残基构成^[10]。利用 ClustalX 和在线软件 ESPript (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>)对 嗜热嗜热厌氧菌(*T. tengcongensis* MB4)中丙氨酸

消旋酶(TtAlr、TtDadX)、*Bacillus anthracis* (Ames) 的 BaxAlr、*Pseudomonas aeruginosa* 的 PaoDadX 和 *Bacillus pseudofirmus* OF4 的 OF4DadX 进行同源序列比对并分析其底物通道氨基酸位点的保守性发现, TtAlr 的底物通道内有 6 个氨基酸残基严

格保守(A172、Y268、Y287、R293、R313、I358), 存在 2 个非保守的氨基酸位点(S173 和 Q360)^[13], TtDadX 同样存在着 2 个非保守氨基酸残基(S171 和 H359)^[14], 其余 6 个位点(D172、Y267、Y286、R292、R312、I357)严格保守(图 1)。

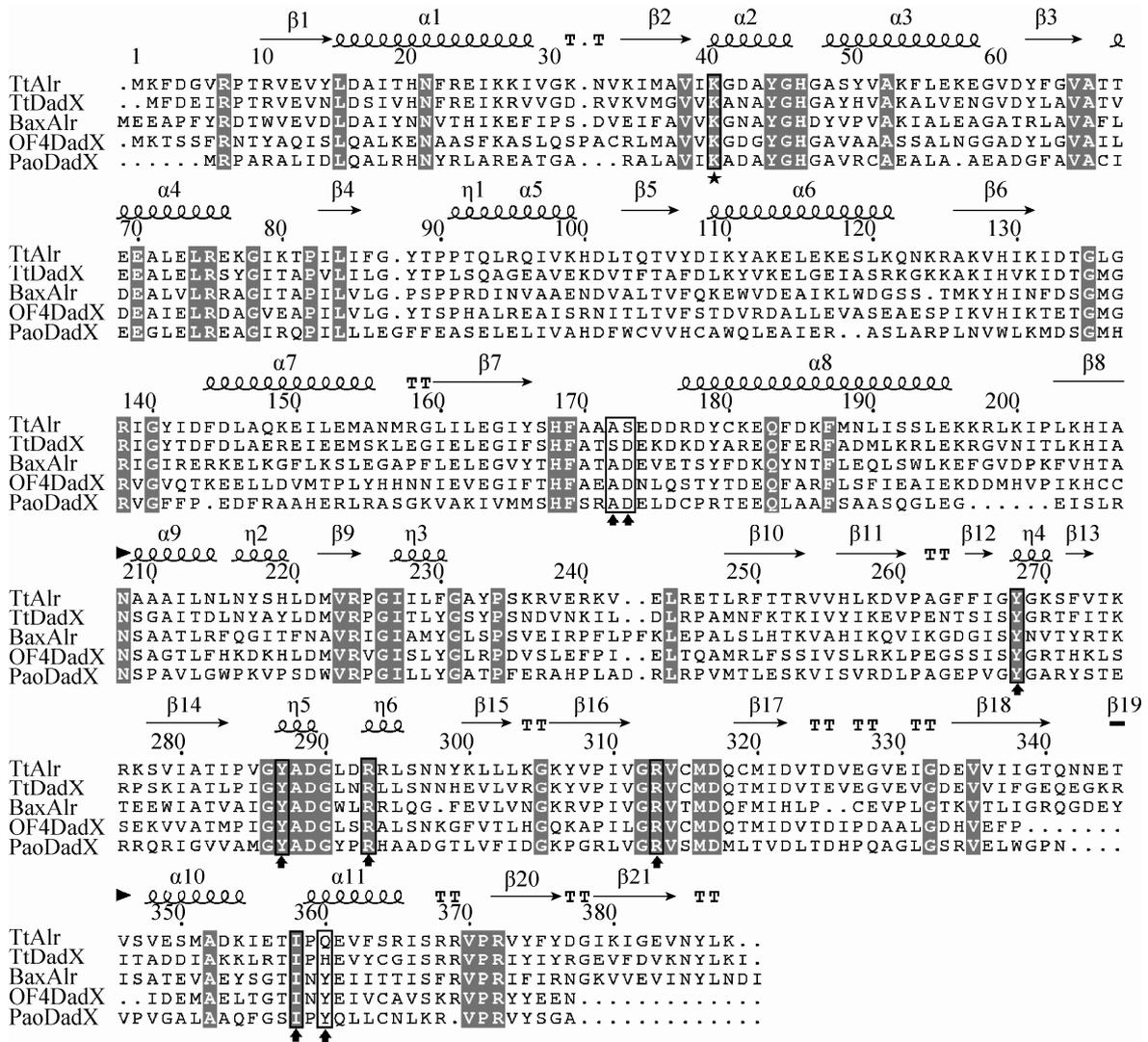


图 1. 基于丙氨酸消旋酶二级结构的氨基酸序列比对

Figure 1. Structural-based amino acid sequences alignment of alanine racemases. Amino acid sequences of alanine racemase from *Bacillus anthracis* (Ames) (BaxAlr), *Pseudomonas aeruginosa* (PaoDadX), and *Bacillus pseudofirmus* OF4 (OF4DadX) are aligned with TtAlr and TtDadX from *T. tengcongensis* MB4. Amino acids are numbered and secondary structures are labeled, the eight strictly conserved amino acids are marked with an arrow (▲). Two key catalytic residues Lys40 and Tyr268 are respectively marked with a star (★) and an arrow (▲).

研究发现, 蛋白 TtAlr 中 Q360 位点突变为酪氨酸(Y, 保守氨基酸)或组氨酸(H, 模拟 TtDadX 中非保守位点 H359)后突变体的催化活性得到了大幅提升^[13], 而对 TtDadX 中相同空间位置的 H359 进行研究发现, 该位点与非保守位点 S171 协同参与稳定酶蛋白与辅酶 PLP 的结合^[14], 而 S171 位点在空间位置上与 TtAlr 底物通道内保守的 A172 位点相对应, TtDadX 中发挥协同作用的 S171 和 H359 都为非保守氨基酸, 而 TtAlr 中 A172 为保守氨基酸残基, 同时发现 A172 位点附近的 S173 位点为非保守氨基酸, 推测 TtAlr 中 A172 和 S173 位点可能都与 Q360 位点存在相互作用。为了验证上述推论, 选取 TtAlr 中与 S171 空间位置相对应的保守位点 A172 和其附近非保守的 S173 位点作为研究对象, 利用定点突变技术, 将上述 A172 和 S173 位点分别突变为丝氨酸(S, 模拟 S171 位点)和天门冬氨酸(D, 保守氨基酸), 通过 TtAlr 中 A172 和 S173 两位点与 Q360 位点相结

合, 检测突变体的催化活性, 探究 A172、S173 及 Q360 三者之间的相互作用情况, 以确定 TtAlr 底物通道内 A172 和 S173 位点的作用机理。

通过定点突变 PCR、去甲基化、双酶切以及序列测定等实验, 成功构建了 8 个突变质粒: pET-A172S、pET-A172S Q360Y、pET-A172S Q360H、pET-A172S S173D Q360Y、pET-A172S S173D Q360H、pET-S173D、pET-S173D Q360Y、pET-S173D Q360H。

2.2 丙氨酸消旋酶的诱导表达和纯化

将 pET-TtAlr、pET-Q360Y、pET-Q360H 以及上述 8 个突变质粒转入 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中, 经扩培、IPTG 诱导、菌体收集、超声波破碎后离心取上清, 通过 Ni-NTA 亲和层析柱纯化、脱盐, 获得了 TtAlr、Q360Y、Q360H 及 S173D 等共 11 个酶蛋白。经 12.5% 的 SDS-PAGE 检测, 所有酶蛋白均在 45.0–66.2 kDa 之间有单一且清晰的条带, 约 55 kDa (图 2), 与理论分子量基本一致。

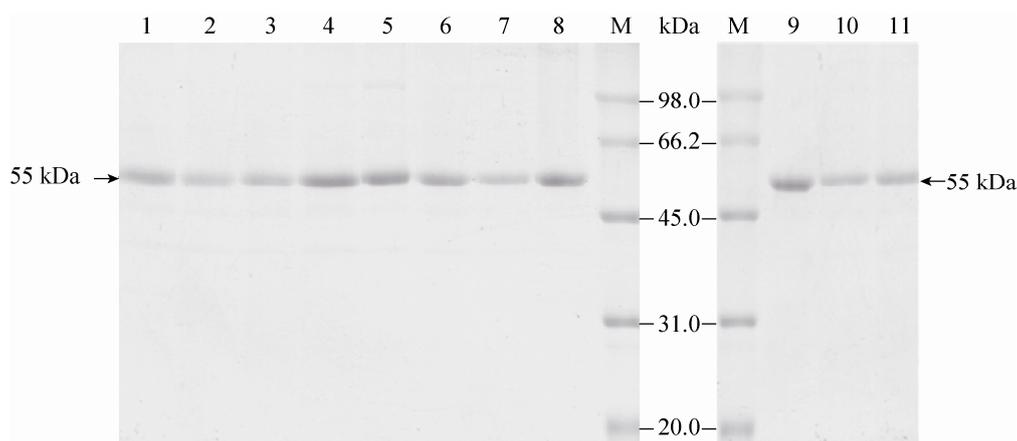


图 2. 丙氨酸消旋酶蛋白纯化后 SDS-PAGE 检测

Figure 2. SDS-PAGE identification for purification of alanine racemases. Lane 1: A172S; lane 2: A172S&Q360Y; lane 3: A172S&Q360H; lane 4: S173D; lane 5: S173D&Q360Y; lane 6: S173D&Q360H; lane 7: A172S&S173D&Q360Y; lane 8: A172S&S173D&Q360H; lane 9: Q360Y; lane 10: Q360H; lane 11: TtAlr; M: Low molecular weight standards.

2.3 酶学特性分析

2.3.1 最适反应温度和 pH: 在不同 pH (7.0–12.0) 或不同温度 (50–90 °C) 条件下测定 TtAlr 和突变体蛋白的相对活性, 如图 3 所示, 野生型蛋白 TtAlr 和 5 个突变体蛋白 (Q360Y、Q360H、A172S、A172S&Q360Y 和 A172S&Q360H) 在不同温度或 pH 下的相对活性趋势基本一致, 最适反应 pH 和温度均为 10.38 和 65 °C; 而其余 5 个突变体 S173D、A172S&S173D&Q360Y、A172S&S173D&Q360H、S173D&Q360Y 和 S173D&Q360H 的最适反应 pH 及温度则为 11.20 和 80 °C (图 3-A, B)。图 3 结果显示含有 S173 位点突变的酶蛋白最适反应温度均比野生型 TtAlr 提高 15 °C, 说明该位点可能是影响酶蛋白最适反应温度的关键位点。

2.3.2 突变消旋酶的相对活性: 经 BCA 试剂盒测定各蛋白浓度后, 以野生型 TtAlr 为标准, 取等量蛋白测定其相对活性, 结果如图 4 所示。野生型蛋白 TtAlr 的相对活性为 100.00%, 单点突变体 Q360Y 的相对活性较高 (210.58%), 其次是 Q360H (164.74%) 和 A172S (154.72%), 而突变体 S173D 的

相对活性最低, 仅为野生型的 24.44%; 当 172 位点由丙氨酸(A)突变丝氨酸(S)后导致突变体酶蛋白的相对活性均有所提高, 如 A172S (154.72%)、A172S&Q360Y (218.76%) 和 A172S&Q360H (179.65%); 当将 173 位点的丝氨酸(S)突变为天冬氨酸(D)后则导致突变体酶蛋白的相对活性均大幅下降, 如 S173D (24.44%)、S173D&Q360Y (169.85%)、S173D&Q360H (123.79%)、S173D&A172S&Q360Y (172.19%) 和 S173D&A172S&Q360H (131.49%) (图 4)。这些结果说明, 172、173 以及 360 位点均可能是影响酶蛋白催化活性的关键位点。

2.4 突变消旋酶的稳定性

通过测定在 65 °C 下处理不同时间后各蛋白的相对活性确定酶蛋白的半衰期, 即热稳定性。从图 5 可以看出, 野生型 TtAlr 的半衰期为 2.5 h, 突变体 Q360Y 的半衰期为 3 h, Q360H 的半衰期为 1.5 h, 以及 A172S 的半衰期为 30 min; 而突变体 A172S&Q360H 的半衰期仅为 4.5 min, 其次是 A172S&S173D&Q360H, 其半衰期为 9 min; 突变体 A172S&Q360Y 和 A172S&S173D&Q360Y

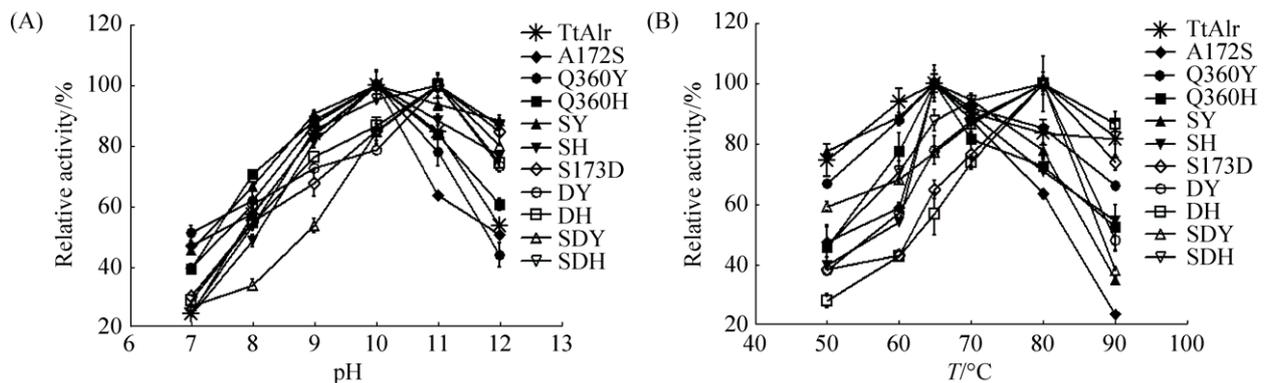


图 3. 突变消旋酶的酶学特性

Figure 3. Enzymatic properties of mutated proteins. A: Optimal pH; B: Optimal temperature. SY: A172S&Q360Y; SH: A172S&Q360H; DY: S173D&Q360Y; DH: S173D&Q360H; SDY: A172S&S173D&Q360Y; SDH: A172S&S173D&Q360H. The data were presented as the mean \pm SD, and the experiments were performed in triplicates with similar results using three independent purified proteins.

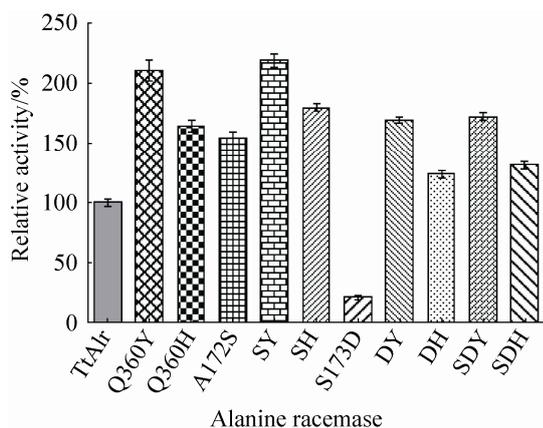


图 4. 突变消旋酶的相对活性

Figure 4. Relative activity of mutated alanine racemases. SY: A172S&Q360Y; SH: A172S&Q360H; DY: S173D&Q360Y; DH: S173D&Q360H; SDY: A172S&S173D&Q360Y; SDH: A172S&S173D&Q360H. The data were presented as the mean \pm SD, and the experiments were performed in triplicates with similar results using three independent purified proteins.

的半衰期也有所增加, 分别为 45 min 和 67 min。从这些结果可以看出, 当 172 位点由丙氨酸(A)突变为丝氨酸(S)时酶蛋白的半衰期急剧下降, 如 A172S&Q360H 和 A172S&Q360Y 的半衰期均比 Q360H 和 Q360Y 的半衰期显著缩短; 而当 173 位点由丝氨酸(S)突变为天门冬氨酸(D)后, 突变体蛋白的半衰期则有所延长, 如 A172S&S173D&Q360H 的半衰期是 A172S&Q360H 的 1 倍, A172S&S173D&Q360Y 的半衰期则比 A172S&Q360Y 的半衰期长了近 20 min。由于突变体 S173D、S173D&Q360Y、S173D&Q360H 这 3 个酶蛋白较为稳定, 在 65 °C 下处理 7 h, 其酶蛋白活性仍保持在 83.6%、76.1% 和 78.1%, 蛋白稳定性与野生型 TtAlr、Q360Y、Q360H 及其他突变体相比得到了显著提高(结果未显示)。

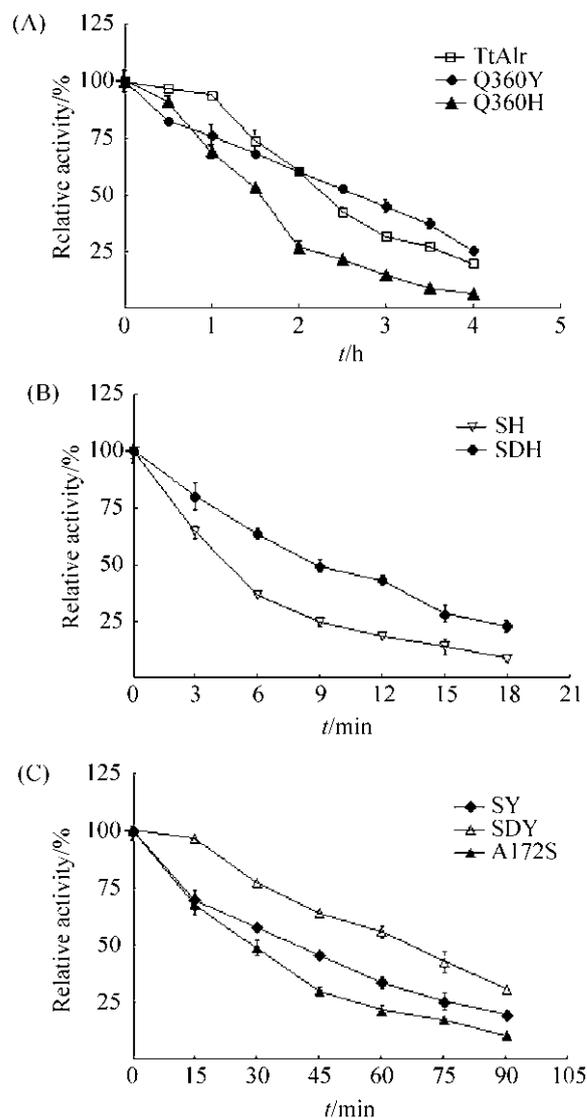


图 5. 丙氨酸消旋酶及突变体的稳定性

Figure 5. The stability of mutated alanine racemases. SH: A172S&Q360H; SDH: A172S&S173D&Q360H; SY: A172S&Q360Y; SDY: A172S&S173D&Q360Y. The data of every spots were presented as the mean \pm SD, and the experiments were performed in triplicates with similar results using three independent purified proteins.

3 讨论

丙氨酸消旋酶可分为两类: 生物合成型(Alr)

和分解代谢型(DadX/B),前者参与细胞壁肽聚糖层 D-Ala 的合成,后者参与 L-Ala 分解代谢。由于该基因是细菌细胞壁合成所必需的基因之一^[17],而在高等生物体内尚未发现丙氨酸消旋酶,因此可以将丙氨酸消旋酶作为抗菌药物筛选的靶标^[10]。

本实验研究的腾冲嗜热厌氧菌(*T. tengcongensis* MB4)中含有分解型和合成型两种消旋酶(TtDadX、TtAlr),通过同源序列比对发现这两个丙氨酸消旋酶的底物通道内分别含有 2 个非保守的氨基酸位点(TtDadX: S171、H359; TtAlr: S173、Q360)^[13]。Patrick 等研究 *Geobacillus stearothermophilus* 中丙氨酸消旋酶底物通道内氨基酸位点 Y354 时,发现该 Y354 位点参与调控底物特异性^[18]; Sun 等将 TtAlr 中 Q360 突变为保守的酪氨酸(Y)后,突变体 Q360Y 的表观二级常数比野生型提高了 18 倍^[13],说明该位点也可能是影响酶蛋白催化活性的关键位点。Xue 等通过定点突变技术探究了 TtDadX 底物通道内层两个非保守的氨基酸位点(S171 和 H359)之间的相互作用,发现 2 个位点相互协同参与稳定酶蛋白与辅酶的结合^[14]。Wu 等研究了 *E. coli* 中丙氨酸消旋酶(EcAlr)底物通道中间层氨基酸位点 D164 的作用机理,发现该位点与底物通道外层的 E165 以及 2 个带正电的氨基酸位点 R280 和 R300 一起在底物定位中起着重要作用^[5]。这些研究说明底物通道中间层和内层各氨基酸位点对于酶蛋白的催化作用是必不可少的,它们分别起着或大或小的作用。

本研究通过定点突变将 TtAlr 中的 173 位点由丝氨酸(S)突变为天门冬氨酸(D)后,尽管突变体 S173D 的相对活性仅为野生型的 24.44%,但该突变体蛋白的最适反应温度比野生型提高 15 °C,且含有该位点突变的突变蛋白 A172S&S173D&Q360H (半衰期为 9 min)和 A172S&S173D&Q360Y (半衰期

为 67 min)的热稳定性均相应地比 A172S&Q360H (半衰期为 4.5 min)及 A172S&Q360Y (半衰期为 45 min)有所提高。同样,含有 S173D 突变的酶蛋白 S173D、S173D&Q360Y、S173D&Q360H 与 TtAlr、Q360Y、Q360H 相比,尽管酶活力下降,但其热稳定性大幅提升(65 °C 处理 7 h 后,相对酶活仍然超过 80%),这可能是因为 S173 位点突变为 D 后,该位点的侧链由羟基基团变为羧基基团,增加了一个氢键受体,增强了该位点与周边各分子间的相互作用力,提高了酶蛋白的稳定性。Im 等通过解析来自 *Streptococcus pneumoniae* 的丙氨酸消旋酶 SpAlr 的三维结构,发现了该蛋白中与 TtAlr 的 S173 相对应的氨基酸位点 D170 通过氢键与周围的水分子及 Y263、Y282'、R288'、R307'、Y352 共同作用形成一个六边形氢键网络结构,作者认为该结构与酶蛋白的结构稳定性、底物移动或质子转移相关,参与影响酶蛋白的结构稳定性或催化活性^[11]。这个发现与将 TtAlr 中 S173 突变为 D 后导致突变体蛋白的稳定性和催化活性都发生改变的结果相吻合。而当将 TtAlr 中的 172 位点由丙氨酸(A)突变为丝氨酸(S)后,突变体蛋白的相对酶活有所提高,但该位点突变后导致其半衰期大幅下降(图 5)。陈路清等认为丝氨酸和苏氨酸通常通过氢键和蛋白质周围的水分子发生相互作用,结合的水分子在高温下释放出来导致蛋白质和水分子结合的局部结构不稳定从而导致整个蛋白不稳定^[19]。在 TtAlr 酶蛋白中,由 A172 位点参与的突变(S172),导致突变酶蛋白催化活力提高,热稳定性大幅下降;而 S173 位点参与的突变(D173),提高突变酶蛋白的最适反应温度和热稳定性,降低其催化活性;总之,丙氨酸消旋酶 TtAlr 底物通道内 A172 和 S173 两位点都是影响酶蛋白的催化活性和稳定性的关键位点。

参考文献

- [1] Milligan DL, Tran SL, Strych U, Cook GM, Krause KL. The alanine racemase of *Mycobacterium smegmatis* is essential for growth in the absence of D-Alanine. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(22): 8381–8386.
- [2] Wei Y, Qiu W, Zhou XD, Zheng X, Zhang KK, Wang SD, Li YQ, Cheng L, Li JY, Xu X, Li MY. Alanine racemase is essential for the growth and interspecies competitiveness of *Streptococcus mutans*. *International Journal of Oral Science*, 2016, 8(4): 231–238.
- [3] Chesnokova ON, McPherson SA, Steichen CT, Turnbough CL. The spore-specific alanine racemase of *Bacillus anthracis* and its role in suppressing germination during spore development. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(4): 1303–1310.
- [4] Tassoni R, van der Aart LT, Ubbink M, van Wezel GP, Pannu NS. Structural and functional characterization of the alanine racemase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 483(1): 122–128.
- [5] Wu DL, Hu TC, Zhang L, Chen J, Du JM, Ding JM, Jiang HL, Shen X. Residues Asp164 and Glu165 at the substrate entryway function potently in substrate orientation of alanine racemase from *E. coli*: Enzymatic characterization with crystal structure analysis. *Protein Science*, 2008, 17(6): 1066–1076.
- [6] Tripathi SM, Ramachandran R. Overexpression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of Rv2780 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Acta Crystallographica*, 2008, 64(5): 367–370.
- [7] Kobayashi J, Yukimoto J, Shimizu Y, Ohmori T, Suzuki H, Doi K, Ohshima T. Characterization of *Lactobacillus salivarius* alanine racemase: short-chain carboxylate-activation and the role of A131. *SpringerPlus*, 2015, 4: 639.
- [8] Wasserman SA, Daub E, Grisafi P, Botstein D, Walsh CT. Catabolic alanine racemase from *Salmonella typhimurium*: DNA sequence, enzyme purification, and characterization. *Biochemistry*, 1984, 23(22): 5182–5187.
- [9] LeMagueres P, Im H, Ebalunode J, Strych U, Benedik MJ, Briggs JM, Kohn H, Krause KL. The 1.9 Å crystal structure of alanine racemase from *Mycobacterium tuberculosis* contains a conserved entryway into the active site. *Biochemistry*, 2005, 44(5): 1471–1481.
- [10] Couñago RM, Davlieva M, Strych U, Hill RE, Krause KL. Biochemical and structural characterization of alanine racemase from *Bacillus anthracis* (Ames). *BMC Structural Biology*, 2009, 9: 53.
- [11] Im H, Sharpe ML, Strych U, Davlieva M, Krause KL. The crystal structure of alanine racemase from *Streptococcus pneumoniae*, a target for structure-based drug design. *BMC Microbiology*, 2011, 11: 116.
- [12] Wang Y, Li YZ. Application and preparation methods of D-alanine. *Liaoning Chemical Industry*, 2003, 32(2): 58–60. (in Chinese)
王颖, 李云政. D-丙氨酸的用途及制备方法. *辽宁化工*, 2003, 32(2): 58–60.
- [13] Sun XL, He GZ, Wang XY, Xu SJ, Ju JS, Xu XL. Crystal structure of a thermostable alanine racemase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 reveals the role of Gln360 in substrate selection. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0133516.
- [14] Xue ZW, Hu Y, Xu SJ, Ohnishi K, Ma YH, Ju JS, Zhao BH. Characterization and preliminary mutation analysis of a thermostable alanine racemase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4. *Extremophiles*, 2013, 17(4): 611–621.
- [15] Ju JS, Misono H, Ohnishi K. Directed evolution of bacterial alanine racemases with higher expression level. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 100(3): 246–254.
- [16] Soda K. Microdetermination of D-amino acids and D-amino acid oxidase activity with 3, methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. *Analytical Biochemistry*, 1968, 25(1): 228–235.
- [17] Ju JS, Xu SJ, Furukawa Y, Zhang Y, Misono H, Minamino T, Namba K, Zhao BH, Ohnishi K. Correlation between catalytic activity and monomer-dimer equilibrium of bacterial alanine racemases. *The Journal of Biochemistry*, 2011, 149(1): 83–89.
- [18] Patrick WM, Weisner J, Blackburn JM. Site-directed mutagenesis of Tyr354 in *Geobacillus stearothermophilus* alanine racemase identifies a role in controlling substrate specificity and a possible role in the evolution of antibiotic resistance. *ChemBioChem*, 2002, 3(8): 789–792.
- [19] Chen LQ, Zhang XY, Tang YJ, He GQ, Ruan H, Chen QH. Progress in the molecular mechanism and strategies for thermostability of thermophilic enzyme. *Bulletin of Science and Technology*, 2008, 24(6): 792–798. (in Chinese)
陈路清, 张秀艳, 唐艳捷, 何国庆, 阮晖, 陈启和. 嗜热酶的稳定机制和稳定策略的研究进展. *科技通报*, 2008, 24(6): 792–798.

Function of amino acid sites in the substrate entryway of alanine racemase TtAlr from *Thermoanaerobacter tengcongensis*

Guangzheng He¹, Qingqing Han¹, Shujing Xu^{1,2}, Baohua Zhao¹, Jiansong Ju^{1*}

¹ College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, Hebei Province, China

² College of Tourism, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, Hebei Province, China

Abstract: [Objective] In order to study the function of amino acid sites A172 and S173 in the substrate entryway of alanine racemase TtAlr from *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4. [Methods] The mutant vectors were constructed by site-directed mutagenesis PCR using plasmid pET-TtAlr as the template and expressed in *E. coli* BL21(DE3). The enzymes were purified by affinity chromatography. D-amino acid oxidase coupling method was used to detect enzyme activity and stability of each mutant and wild type TtAlr proteins. [Results] Both TtAlr and mutant proteins were expressed and purified successfully. Results of enzymatic properties show that A172 site mutation could improve the catalytic activity of TtAlr, but the stability of enzyme proteins decreased significantly. Likewise, S173 site mutation could increase the optimal temperature of TtAlr, prolonged the half-life of the enzyme and improved its stability, but the catalytic activity of the enzyme decreased significantly. [Conclusion] A172 and S173 amino acids residues in the substrate entryway of alanine racemase TtAlr were the key sites that played a major role in the catalytic activity and stability of the enzyme protein.

Keywords: alanine racemase, substrate entryway, conservative amino acid sites, site-directed mutagenesis, enzymatic properties

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2015205212, C2016205130), by the Foundation of Hebei Educational Committee (ZD2017047) and by the Science Fundation of Hebei Normal University (sj2016013)

*Corresponding author. Tel: +86-311-80787573; Fax: +86-311-80789794; E-mail: jujiansong@126.com

Received: 31 August 2017; Revised: 30 October 2017; Published online: 14 November 2017