

上海交通大學

# SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY

# 学士学位论文

THESIS OF BACHELOR



论文题目: 井冈霉烯胺设计途径中氨基转移 酶底物识别机制研究

学生姓名:_	危笑冬
学生学号:_	516111910024
专业:_	生物工程
指导教师:_	崔莉
学院(系):	生命科学技术学院



#### 摘要

井冈霉烯胺是代表性 C<sub>7</sub>N 氨基假糖类化合物,与葡萄糖结构相似,具有较强的糖苷酶 抑制剂活性,是糖代谢相关疾病药物研发的重要前体。由于其结构中存在多个手性中心,化 学合成存在着步骤复杂、产率较低等问题。本实验室前期研究依据合成生物学设计理念,通 过引入高立体选择性的异源转氨酶 WecE 和 BtrR,成功将井冈霉素生物合成中间产物—— 井冈霉烯酮转化为井冈霉烯胺和 β-井冈霉烯胺;并采用半理性设计的方法对氨基转移酶 WecE 进行了优化,获得了催化活力提高的优秀突变体。

本论文中表达了井冈霉烯胺设计合成途径中糖氨基转移酶 WecE 野生型及其 Y321F、 VarA、VarB 等三个优秀突变体,通过 L-谷氨酸脱氢酶偶联反应法测定了野生型和突变体的 酶反应动力学参数,评价了不同突变残基对酶催化活力提升的贡献;通过分子对接、动力学 模拟等计算生物学手段,结合氨基酸生化性质分析,探讨了野生型 WecE 和最优突变体 VarB 与底物中间体的相互作用,揭示了突变体活力提高的分子机制。同时,采用计算生物学手段, 对 WecE 和 BtrR 与反应中间体相互作用、活性中心关键氨基酸残基进行了比较分析,提出 了由西夫碱中间体顺反异构引起糖环翻转,产生不同氨基构型产物的立体选择性机制;依据 非天然底物井冈霉烯酮的结构特征和 WecE 和 BtrR 对其的识别规律,对系列功能性糖胺化 合物进行了逆向分解,推断了其潜在的羰基合成底物,并探讨了 WecE 和 BtrR 对非天然底 物的识别能力。本论文通过氨基转移酶对非天然底物识别机制的研究,揭示了活性中心关键 氨基酸与非天然底物的作用机制,突破了氨基转移酶底物识别的传统认知,证实该氨基转移 酶家族成员可以直接识别无 NDP 或磷酸化修饰的吡喃糖环;为依据合成生物学理念,采用 氨基转移酶直接识别吡喃糖羰基前体合成功能糖胺奠定了重要的理论基础。

关键词:人工设计途径,糖氨基转移酶,非天然底物,酶反应动力学,催化机制



# STUDY ON THE SUBSTRATE RECOGNITION MECHANISM OF AMINOTRANSFERASE IN THE DESIGN PATHWAY OF VALIENAMINE

#### ABSTRACT

 $C_7N$  amino cyclic alcohols belong to pseudo-aminosugars, whose core structure is similar to the  $\alpha$ -D-glucose, so they have certain  $\alpha$ -glucosidase inhibitor activity. The representative pseudoaminosugars are valiolamine, valienamine and  $\beta$ -valienamine. Because of the multiple chiral centres in their structure, there are many problems in chemical syntheses, such as complicated steps and low yield. Based on the analysis of natural synthesis pathway of validamycin and the concept of synthetic biology design, valienone, the intermediate metabolites of validamycin, was successfully transformed into valuenone and  $\beta$ -valuenone respectively by introducing high stereoselective heterotransaminase WecE and BtrR. The enzyme WecE was optimized by semi-rational design to gain excellent mutants with improved catalytic activity. In this paper, we expressed wild-type transaminase WecE and three mutants, including Y321F, VarA, VarB. We determined the kinetic parameters of the enzyme reaction by L-glutamate dehydrogenase coupling reaction. We also discussed the interaction between substrate intermediates and enzymes, wild-type WecE and optimal mutant VarB, by molecular docking and molecular dynamics simulation. At the same time, through computational biology, the critical amino acid residues of different stereoselectivity formed by the interaction between WecE and BtrR and the intermediates involved in the reaction were analyzed, and the molecular mechanism of different stereoselectivity was proposed. According to the structural characteristics and recognition rules of WecE and BtrR for valienone, we inferred the potential carbonyl synthesis substrates of a series of functional aminosugars. The recognition ability of WecE and BtrR for these non-natural substrates was discussed. In this paper, we studied the mechanism of substrate recognition of aminotransferase and revealed the mechanism of action between the vital amino acids of the active centre and the non-natural substrate. It is confirmed that the members of the aminotransferase family can directly recognize the pyranose ring without NDP or phosphorylation modification. This research established the foundation to directly recognize pyranosamine carbonyl precursor compound by using aminotransferase per the concept of synthetic biology.

**Key words:** artificial design pathway, sugar aminotransferase, non-natural substrate, enzyme reaction kinetics, catalytic mechanism



	E
H	乑

第一章	绪论	<u>}</u>	1
1.1	引言	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	1
1.1.	.1	氨基糖类及氨基假糖类化合物	1
1.1.	.2	氨基假糖类化合物的功能	2
1.1.	.3	氨基假糖类化合物的合成	2
1.1.	.4	人工设计途径合成氨基假糖类化合物	3
1.2	氨基	转移酶	4
1.2.	.1	氨基转移酶	4
1.2.	.2	糖氨基转移酶	5
1.3	酶分	子进化与酶反应动力学	5
1.3.	.1	酶分子进化	5
1.3.	.2	高通量筛选法	6
1.3.	.3	酶反应动力学	7
1.4	课题	J研究内容及意义	7
第二章	W	'ECE 突变体活力提升分子机制研究	9
2.1	引言		9
2.2	实验	对料	9
2.2.	.1	菌株	9
2.2.	.2	实验材料与试剂	9
2.2.	.3	主要培养基及缓冲试剂配制	9
2.2.	.4	实验器材1	0
2.3	实验	这方法1	0
2.3.	.1	目标蛋白的诱导表达1	0
2.3.	.2	目标蛋白的纯化1	1
2.3.	.3	酶动力学参数测定1	2
2.3.	.4	分子动力学模拟1	3
2.4	结果	4与讨论1	3
2.4.	.1	候选酶的表达与纯化1	3
2.4.	.2	酶动力学参数测定1	3
2.4.	.3	催化活力提升的机制分析1	5
第三章	候选	氨基转移酶立体选择性机制分析1	6
3.1	引言	ī1	6
3.2	材料	与工具1	6
3.2.	.1	蛋白晶体结构检索1	6
3.2.	.2	同源建模1	6
3.2.	.3	分子对接1	6



3.2.4	4 结构对比	16
3.3	结果与讨论	
3.3.1	1 立体选择性机制分析	
第四章	候选氨基转移酶 非天然底物催化能力探究	21
4.1	引言	21
4.2	实验材料	21
4.2.1	1   菌株	21
4.2.2	2 实验材料与试剂	21
4.2.3	3 主要培养基及试剂配制	
4.2.4	4 实验器材	
4.3	实验方法	
4.3.1	1 蛋白表达	
4.3.2	2 目标蛋白的纯化	
4.3.3	3 非天然底物反应检测	24
4.4	结果与讨论	25
4.4.1	1 功能糖胺非天然底物的推测	25
4.4.2	2 高效液相色谱检测结果	
第五章	结论与展望	27
参考文献	武	
致谢		



## 第一章 绪论

#### 1.1 引言

氨基糖类化合物或称糖胺类化合物,是吡喃糖环中羟基被氨基取代的糖类分子。在自然 界中,大多以多糖、糖蛋白、低聚糖等形式广泛存在于微生物、动植物体内;并在分子识别、 信号转导、细胞分化和遗传发育等生物学过程中发挥重要作用。C<sub>7</sub>N 氨基环醇类化合物属于 氨基假糖类化合物,其代表性化合物井冈霉醇胺(Valiolamine)(5-氨基-1-(羟甲基)-环己 -1,2,3,4-四元醇)、井冈霉烯胺(Valienamine)((1*S*,2*S*,3*S*,4*R*)-1-氨基-5-(羟甲基)环己-5-烯-2,3,4-三元醇)和β-井冈霉烯胺(β-Valienamine)((1*R*,2*S*,3*S*,4*R*)-1-氨基-5-(羟甲基)环己-5-烯-2,3,4-三元醇),具有与天然葡萄糖相似的吡喃结构(图 1-1),对葡萄糖苷酶、麦芽糖酶、淀粉酶 等α-糖苷酶具有强烈的竞争性抑制作用,是糖尿病、癌症及溶酶体贮积症等重大疾病新型药 物先导化合物的重要源泉。



图 1-1 葡萄糖与代表性氨基假糖类化合物结构

由于其结构中含有多手性中心,化学合成存在工艺复杂、污染严重等问题,因此,近年 来探索其生物合成途径已成为药物合成研究的热点。井冈霉烯胺和井冈霉醇胺是微生物磷酸 戊糖通路的次级代谢产物,以7-磷酸景天庚酮糖为直接前体,环化得到该类化合物的核心六 元环结构。在实验室前期研究中,采用而合成生物学设计理念,以吸水链霉菌代谢合成井冈 霉烯酮途径为基础,设计并构建了利用外源氨基转移酶 WecE 和 BtrR 将井冈霉烯酮成功转 化为井冈霉烯胺和 β-井冈霉烯胺的人工生物合成途径;并通过半理性设计进化了候选氨基 转移酶对非天然底物井冈霉烯酮的催化能力,获得了催化活力提高的优秀突变体。

基于前期工作基础,本课题采用 L-谷氨酸脱氢酶偶联氨基转移酶的检测方法,测定比较了井冈霉烯胺设计合成途径中野生型氨基转移酶和突变体对井冈霉烯酮的分子动力学参数;采用分子动力学模拟探讨了优秀突变体的活性提升机制。同时,本课题还对特异性催化井冈霉烯酮生成不同立体构型氨基产物的糖氨基转移酶 WecE 和 BtrR 进行了立体选择机制分析;对其他功能糖胺的结构进行了逆向分解,推测了其设计合成的前体底物;并对候选酶潜在的非天然底物的催化能力进行了初步探索,为依据合成生物学理念,采用氨基转移酶直接识别吡喃糖胺羰基前体化合物设计合成氨基糖类及假糖类化合物奠定了基础。

1.1.1 氨基糖类及氨基假糖类化合物

目前自然界中已有报道的糖胺有六十多种,它们大多属于次级代谢产物,作为生物活性 分子的组成部分<sup>[1]</sup>。例如氨基葡萄糖作为典型的氨基化糖类分子,其自身能够作为小分子信 号,调节人体代谢活动;而通常情况下,氨基葡萄糖及其衍生物可在生物体内合成壳聚糖, 几丁质等参与生物体的构建,或者以链霉素的形式存在,具有抗生素活性<sup>[2]</sup>。以阿拉伯糖或 半乳糖为前体生成的阿拉伯糖胺或半乳糖胺更多地参与到细胞结构或功能单元如脂多糖等

第1页共31页



的合成。3-氨-3-脱氧-D-葡萄糖能够以单体的形式存在,并起到抗生素作用,但其同时也作 为卡那霉素 A 的核心成分<sup>[3]</sup>。代表性氨基假糖化合物井冈霉烯胺和井冈霉醇胺分别是抗水 稻纹枯病井冈霉素 A 和井冈霉素 G 的核心结构单元<sup>[4]</sup>,同时也是糖尿病临床治疗药物阿卡 波糖和和伏格列波糖的功能单元<sup>[5]</sup>。而 β-井冈霉烯胺作为组成单元存在于天然产物 Pyralomicin 1c 的结构中<sup>[6]</sup>,同时也是抗溶酶体贮集症和 Gaucer 症药物 N-辛酰-β-井冈霉烯胺 的开发前体<sup>[7]</sup>(图 1-2)。



图 1-2 含有假糖胺结构单元的天然产物及其功能

#### 1.1.2 氨基假糖类化合物的功能

井冈霉烯胺等假糖胺类化合物可以可逆性地结合肠道内的 α-葡萄糖苷酶,竞争性抑制 多糖分解为单糖的过程,从而延迟病人餐后血糖快速升高<sup>[9][10]</sup>。基于 α-糖苷酶抑制剂活性, 氨基假糖类化合物被认为是糖尿病、癌症等多种糖代谢相关疾病药物开发的重要前体。例如 目前临床上广泛使用的 II 型糖尿病治疗药物伏格列波糖和阿卡波糖,正是以井冈霉醇胺或 井冈霉烯胺为前体开发合成的氨基假糖类药物; N-辛烷基-β-井冈霉烯胺可用于治疗高血症 等疾病,而 Cetoniacyton A 则可以作为抗肿瘤药物,治疗癌症尤其是糖尿病并发性癌症。也 有研究指出,丙型肝炎病毒(HCV)糖蛋白具有重 N-糖基化的特点,而 α-葡萄糖苷酶抑制 剂可通过扰乱 N-糖基化途径抑制病毒蛋白的合成<sup>[11]</sup>。类似的,α-葡萄糖抑制剂在艾滋病(HIV) 的治疗中,表现出对艾滋病毒抑制活性<sup>[11][12]</sup>。除此之外,吸水链霉菌天然次级代谢产物井冈 霉素 A,作为生物农药治疗水稻纹枯症,是东亚应用范围最广的农药。总之,假糖胺类化合 物,能够通过抑制 α-糖苷酶活性,抑制多种糖代谢相关或异常疾病,具有广阔的潜在应用前 景和市场价值。

#### 1.1.3 氨基假糖类化合物的合成

二十世纪八十年代以来,化学界一直努力实现氨基假糖类化合物的化学合成;建立了从 天然产物如奎宁酸、D-葡萄糖、苄化阿拉伯糖等吡喃结构合成井冈霉醇胺与井冈霉烯胺的方 法<sup>[17]</sup>。此外,也有研究利用环己肌醇合成栎醇,再进一步合成井冈霉醇胺,以及利用酒石酸 合成井冈霉醇胺<sup>[18]</sup>。例如 Mitsuo Hayashida 小组最早设计了从 D-葡萄糖出发合成乙酰化井 冈霉醇胺的路线<sup>[19]</sup>(图 1-3)。这些化学合成的方法都需要经过较复杂的构型转化以及羟基 保护,合成步骤复杂,反应条件要求较高,且多生成手性中心的消旋产物,导致产物收率低 下等问题。

#### 第2页共31页





图 1-3 化学合成井冈霉烯胺(A)、井冈霉醇胺(B)路线图<sup>[17][19]</sup>

通过微生物半合成法也可以制备井冈霉烯胺。从吸水链霉菌发酵液中可分离获得井冈霉素 A,之后将井冈霉素 A 与裂解菌株共同培养<sup>[13]</sup>。井冈霉素 A 会在裂解菌株的作用下,降 解为 D-葡萄糖与井冈霉亚基胺 A,而井冈霉亚基胺 A 会在裂解菌株的作用下氧化为醇基与 酮基中间体,之后中间体 C-N 键断裂,分别生成井冈霉醇胺和井冈霉烯胺。在适宜温度下 利用裂解菌株发酵井冈霉素 A,收集上清液,通过离子交换柱法,纯化分离得到井冈霉醇胺 或井冈霉烯胺。通常用于裂解井冈霉素 A 生产井冈霉醇胺的裂解菌株包括脱氮假单胞杆菌 和嗜糖黄杆菌<sup>[14]</sup>。工业生产中一般在获得井冈霉烯胺的基础上,进行还原反应得到井冈霉醇 胺。除了利用微生物裂解外,也可以通过 NBS 裂解法,在 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)水溶 液中,用 N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)直接裂解井冈霉亚胺 A,继续氧化断裂 C-N 键得到井 冈霉醇胺<sup>[15][16]</sup>。然而,微生物半合成法得到的井冈霉烯胺的生产过程需要使用两种菌株先 后发酵,操作步骤复杂,收率低,并且由于微生物中酶系复杂,发酵生产中会产生较多的中 间产物,为之后的分离工作带来困难,增加生产成本。因此,开发高效、稳定地氨基假糖类 化合物的合成方法,成为该研究领域的热点问题。

1.1.4 人工设计途径合成氨基假糖类化合物

近年来,随着基因组的解析和大量功能基因的表征,应用合成生物学理念,建立新的代 谢途径,有可能建立新的重要微生物药物的合成途径。通过引入新的功能基因和元件,以及 对功能元件进行重排,从而能够实现重要产品生物合成。例如,美国加州大学伯克利分校的 Jay Keasling 实验室报道了用于大量合成抗疟疾药青蒿素前体——青蒿酸的非天然代谢途径。 他们将来源于不同生物的基因进行了重新设计和组装,从而在酵母工程菌中建立了青蒿酸的 生物合成途径。同时也对该途径中重要催化元件的催化活力进行了进一步改造和优化,将产 物产量提高了若干数量级,使其具有了工业生产的潜力<sup>[20]</sup>。麻省理工学院的 Gregory Stephanopoulos 等通过在大肠杆菌中重建紫杉二烯的合成途径,在发酵液中成功获得了紫杉 醇的前体,为紫杉醇及相关萜类天然产物的大规模生产奠定了生物研究基础。这些研究展示 了通过合成生物学的设计理念,实现珍稀天然产物生物合成的可行性,同时也显示了这一技 术的巨大优势和应用潜力。

#### 第3页共31页



在前期工作中,本实验室通过对井冈霉素 A 代谢合成途径的分析,以合成生物学设计 理念,将吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)代谢合成途径中的环化酶 ValA,异构酶 ValD 以及脱水酶 ValK 进行表征,发现可以直接生物合成井冈霉烯酮,而其与井冈霉烯胺结 构非常类似,仅存在 C6 位置上一个官能团差异,将井冈霉烯酮中的羰基转化为氨基就可以 得到井冈霉烯胺<sup>[21]</sup>。实验课题组以井冈霉烯酮作为非天然底物,从底物相似性出发,募集 了可能的转氨催化元件,并且从中筛选到了一些能够识别并催化井冈霉烯酮进行转氨反应, 并生成井冈霉烯胺的催化元件<sup>[22]</sup>。其中来自大肠杆菌的 WecE 能够将井冈霉烯酮转化为井冈 霉烯胺,而来自环状芽孢杆菌的 BtrR 能够将井冈霉烯酮转化为 β-井冈霉烯胺,并且两者催 化获得氨基产物的 e.e 值能达到 99.9%以上。通过引入外源的氨基转移酶,成功实现了通过 转氨反应将井冈霉烯酮转化为井冈霉烯胺,从而建立了井冈霉烯胺的生物合成方法<sup>[23][24]</sup>(图 1-4);并由此突破了传统的化学合成及生物合成的局限,为氨基假糖类化合物的生物合成开 辟了一条全新、高效的途径。



图 1-4 井冈霉烯胺设计合成途径

由于识别非天然底物能力限制,WecE 对井冈霉烯酮的催化活力不高。前期研究通过生物信息学的方法将WecE 晶体与非天然底物复合物PMP-井冈霉烯酮进行了分子对接,并且通过虚拟氨基扫描的方法,预测了对催化活性提升可能有作用的氨基酸残基位点。通过对这些位点进行迭代饱和突变,获得了突变文库,并通过高通量筛选的方法从突变文库中获得了活力提升的突变体。

#### 1.2 氨基转移酶

1.2.1 氨基转移酶功能

氨基转移酶(transaminase)简称为转氨酶,是指一类能够将 α-氨基酸上的氨基转移给 α-酮酸从而形成新的酮酸和氨基酸的酶。大部分氨基转移酶在发挥作用时,需要结合磷酸吡 哆醛(Pyridoxal Phosphate, PLP)作为辅因子,是一种 PLP 依赖酶。氨基转移酶在自然界中 普遍存在,在细胞中的氮代谢以及氨基转移过程中承担重要角色<sup>[26]</sup>。其具有较高的催化效率 和较高的稳定性,并且相较于传统的化工反应来说,具有高立体选择性,高区域选择性,高 底物特异性的特点<sup>[27]</sup>。因此在生物医药领域中具有广泛的实际应用价值,可以用于生产氨基 酸、氨基醇、氨基糖、手性胺等多种化合物,可以帮助合成多种手性药物或农药产品的中间 体。

根据 Pfam 数据库中的序列分析比对结果显示,氨基转移酶可分为六个亚家族,每个亚家族有各自不同的氨基供体和氨基受体,详见表 1-1。



衣 1-1 氨基转移酶家族					
亚会族	化主酶	主要	主要底物		
业	气衣时	氨基供体	氨基受体		
т Яп	AspAT	L-天冬氨酸	~ 酮戊一酸		
1 (YH 11	AlaAT	L-谷氨酸	U-日内/人——日久		
III	ω-AaAT	β-丙氨酸	丙酮酸		
IV	α-AlaAT	α-丙氨酸	~ 酮戊一酸		
Ĩv	BCAT	L-亮氨酸	u-由内/人——由人		
V	SerAT	L-丝氨酸	丙酮酸		
VI	ArnB	L-谷氨酸	UDP/TDP-酮糖		

1.2.2 糖氨基转移酶

糖氨基转移酶(Sugar aminotransferase, SAT)属于氨基转移酶中的第六亚家族,其氨基 供体为通常为 L-谷氨酰胺或 L-谷氨酸,氨基受体一般为 UDP/TDP-羰基糖,参与细菌的次 级代谢过程,催化生产具有生物活性的氨基糖类化合物<sup>[28][29]</sup>。

在溶液中进行反应时,糖氨基转移酶会倾向于形成二聚体,并且每个单体的活性中心 都位于二聚体的交界处,同时各个单体中的氨基酸残基都会继续发挥底物识别作用<sup>[30]</sup>。从 晶体结构上来看,糖氨基转移酶一般还包括两个结构域,其中大结构域包含七到八股β片 层结构,而小结构域包含四股β结构,由各个单体中的C端形成,其外围围绕着α螺旋 <sup>[31]</sup>。

根据天然底物的不同,第六亚家族还可以继续细分为 VIa, VIb, VIg 三个家族,他 们的天然底物分别为 NDP-4-羰基糖, NDP-3-羰基糖和青蟹肌糖。参与 β-井冈霉烯胺合成 代谢途径的糖氨基转移酶 BtrR 属于 VIg 家族,其天然底物为 2-脱氧-青蟹肌糖胺,催化活 力较高。而参与 α-井冈霉烯胺合成代谢途径的糖氨基转移酶 WecE 属于 VIa 家族,以 TDP-4-氨基-4,6-双脱氧半乳糖作为天然底物,但其催化活力相较于 BtrR 较低<sup>[32]</sup>。

## 1.3 酶分子进化与酶反应动力学

1.3.1 酶分子进化

酶作为一种高效的生物催化剂,具有催化效率高、特异性强、环境友好等优点,尤其在 产物立体选择性高的不对称合成领域具有巨大的优势。但同时,这些酶的生物学特性也使得 酶催化反应具有一定的局限性;例如热不稳定,不耐受酸碱等极端条件,对有机溶剂敏感, 催化非天然底物活力较低等问题<sup>[33]</sup>。因此利用蛋白质工程技术对天然酶分子进行改造和优 化,使得酶能够更好地满足实际生产需要,就显得尤为重要,也为酶的工业生产应用开拓了 更加广泛的前景。

酶进化主要包括定向进化(Directed evolution)、半理性设计(Semi-rational design)和理 性设计(Rational design)三种策略<sup>[34]</sup>。其中定向进化是模仿达尔文进化,在体外进行蛋白 质对应核酸序列的随机突变,一般实验室中常用易错 PCR 进行该步骤,之后在大量突变个 体中筛选出符合预期特征的蛋白个体。该方法不需要事先了解目标蛋白的空间结构以及催化 机制,因此实用性广泛,但是具有盲目性,筛选效率低等确定。而理性设计则利用生物信息 学的手段,综合目的蛋白的氨基酸序列,空间结构,折叠方式等信息,指导蛋白质的改造, 设计出理论上能够完全符合预期目标的蛋白。半理性设计则是通过对氨基酸序列和晶体结构 的综合理性分析,在特定位点区域,例如活性中心,进行序列比对或者结构分析,从中筛选 出关键的氨基酸残基,对它们进行迭代饱和突变(Iterative Saturation Mutagenesis, ISM)或 者组合活性中心饱和突变(Combinatorial Active-Site Saturation Test, CAST)。其中迭代饱和 突变是将选定的关键氨基酸残基进行反复的饱和突变,构建突变文库,从中筛选符合预期结

第5页共31页



果的蛋白[35]。

#### 1.3.2 高通量筛选法

高通量筛选法 (High-throughput screening)可用于酶分子定向进化和蛋白质半理性设计 筛选。在酶进化过程中,对于一个氨基酸残基位点需要进行 19 次突变,若选定了 100 个氨 基酸,则构建的文库大小为 100<sup>19</sup> 个突变体,必须采用高通量筛选的方法。同理,在测定酶 动力学参数时,低底物浓度(酶未饱和)条件下测定的数据才能够进行米氏方程曲线的拟合, 并且该范围内底物梯度越多,拟合效果越好,实验结果越准确。因此需要使用高通量测定的 方法,在较多的底物浓度梯度实验组中,同时测定酶促反应速率。高通量筛选方法一般包括 平板筛选法、微孔板筛选法、荧光激发液滴分选法以及荧光激发细胞分选法等。为了能够高 效地对酶促反应速率进行检测,实验室前期建立了高通量微孔板筛选测定法。在糖氨基转移 酶 WecE 催化 L-谷氨酸与底物并冈霉烯酮生成 α-酮戊二酸与井冈霉烯胺的过程中,没有荧 光信号的生成,不利于反应速率的检测。但是 L-谷氨酸脱氢酶 (L-GDH)可以以上述副产物 α-酮戊二酸为底物,每一分子底物消耗一分子 NADH,生成一分子 NAD+,而 NADH 在 340nm 有吸收峰。因此通过检测 NADH 信号值在转氨反应过程中的下降,便可反推出酶促反应速 率,由此可建立糖氨基转移酶-谷氨酸脱氢酶偶联反应高通量微孔板测定方法<sup>1361</sup>(见图 1-5)。



图 1-5 氨基转移酶-谷氨酸脱氢酶偶联高通量筛选方法

上述 1.1.5 中提及的糖氨基转移酶 WecE 催化非天然底物井冈霉烯酮的活性较低,在分析其空间结构以及氨基酸序列后,采用虚拟氨基酸扫描的方法,确定了其活性中心可能的氨基酸残基突变位点,预测这些位点的突变将对转氨酶活性的提升起到关键性作用。在使用饱和突变的方法构建突变文库后,利用高通量筛选体系,检测突变体的活性提升情况。并选取了其中活性提升较高的突变体 Y321F 进行了二轮、三轮迭代突变,并从突变文库中分别筛选到了高活性突变个体。其中二轮突变得到了突变体 VarA(Y321F, V318R),三轮突变得到了突变体 VarB(Y321F, V318R, F319V),如图 1-6 所示。突变位点对优秀突变体的活力提升的贡献及其活力提升的分子机制仍需进一步探讨。





图 1-6 前期研究中 WecE 迭代饱和突变进化结果

#### 1.3.3 酶反应动力学

酶反应动力学反映酶结合底物的能力以及催化反应速率。许多化学反应的速率随着反应 物浓度的增加而增加。对于一个单底物不可逆反应,底物 S 与酶 E 结合后形成不稳定的中 间络合物 ES,随后即生产产物 P 与游离态的酶 E,当底物浓度增加时,酶促反应速率也随 之不断增大无限接近最大值,这便是"中间产物"学说,由此可推导出反应速率与底物浓度 之间的关系,即米氏方程<sup>[37]</sup>(式 1-1)。

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \tag{1-1}$$

式中  $v_0$ 为初始反应速率, $V_{max}$ 是酶被底物完全饱和时的最大反应速度。[S]为底物初始浓度。 $K_m$ 为米氏常数,其物理意义为反应速度达到最大反应速度  $V_{max}$ 一半时的底物浓度,此时  $K_m$ 与[S]相等,该值反映了酶与特定底物结合的亲和程度,由酶的种类决定,而与酶浓度无关。当底物浓度较低时,随着底物浓度增加,酶促反应速率不断增加,其增长趋势呈非线性。而当底物浓度增加到一定程度时,酶被底物饱和,此时更多的底物并不能被酶催化反应,增加底物浓度对反应速度几乎没有影响,此时可认为反应速度达到最大反应速度。为了较为精确地测定  $K_m$ 与  $V_{max}$ 值,可以利用 origin 作图软件利用米氏方程拟合功能拟合出米氏方程曲线,从而得到该值,也可以采用双倒数法先利用 1/[S]与 1/V 进行作图,根据截距求出  $K_m$ 与  $V_{max}$ 。

#### 1.4 课题研究内容及意义

井冈霉烯胺和 β-井冈霉烯胺等代表性氨基假糖类化合物,是典型的葡萄糖苷酶抑制剂, 是 II 型糖尿治疗病药物伏格列波糖及溶酶体贮集症治疗药物 N-辛酰-β-井冈霉烯胺的合成 前体,在癌症、乙肝、艾滋病等糖代谢相关疾病药物开发中,都具有广阔的应用价值。同时 糖胺类化合物在结构和功能上与氨基假糖类化合物相似,并且在自然界中存在更加广泛,其 市场应用价值更加广阔。然而由于其多手性结构的特殊性,采用化学合成非常困难,存在反 应步骤复杂,收率较低,对映体杂质较多,成本较高,反应条件严苛等问题。氨基转移酶能 够在酮糖类化合物的结构上直接进行转氨反应,获得特定空间构象的对应糖氨基产物,这对 于氨基糖类化合物的不对称生物合成具有十分重要的意义。

本课题前期研究探索了糖氨基转移酶家族对羰基吡喃假糖类化合物井冈霉烯酮的识别 和催化作用,发现氨基转移酶 WecE 和 BtrR 可以识别井冈霉烯酮并且立体特异性的生成井 不同氨基构型的井冈霉烯胺和 β-井冈霉烯胺 (e.e.>99.9%);并通过半理性设计的方法,对 WecE 的催化活力进行了优化,通过高通量筛选的方法,获得了催化活力提高的突变体。

本课题在前期工作基础上,采用 L-谷氨酸脱氢酶偶联法对 WecE 野生型集的活力提升 的突变体进行了酶分子动力学参数测定,比较了不同突变位点对酶催化活力的贡献;采用计



算生物学研究方法,结合酶分子动力学模拟与氨基酸生化性质分析,探讨了酶突变体活力提升的分子机制,比较了氨基转移酶 WecE 和 BtrR 与中间产物相互作用的关键氨基酸残基分布以及产物氨基立体构型的形成机制;并通过糖胺类化合物结构分解,推测了功能糖胺人工设计合成的潜在底物,通过体外酶活检测方法,探索了 WecE 和 BtrR 对潜在非天然底物的催化能力。本课题探究糖氨基转移酶对非天然底物的识别规律,揭示了活性中心关键氨基酸与非天然底物的作用机制,突破了氨基转移酶底物识别的传统认知,证实该氨基转移酶家族成员可以直接识别无 NDP 或磷酸化修饰的吡喃糖环;为依据合成生物学理念,采用氨基转移酶直接识别吡喃糖胺羰基前体化合物奠定了重要的元件和理论基础。



# 第二章 WecE 突变体活力提升分子机制研究

## 2.1 引言

前期研究中,实验室利用井冈霉素生物合成途径中的中间产物井冈霉烯酮为底物,设计 了由异源氨基转移酶 WecE 和 BtrR 催化生成井冈霉烯胺和 β-井冈霉烯胺的生物合成途径; 并采用半理性设计研究方案对氨基转移酶 WecE 进行了功能进化,获得了 WecE 对非天然底 物井冈霉烯酮催化能力提升的优秀突变体。

本研究在此基础上,表达了野生型糖氨基转移酶 WecE 以及 Y321F、VarA、 VarB 等三 种突变体,通过 L-谷氨酸脱氢酶偶联反应方法分别测定了野生型和突变体的酶反应动力学 参数,评价了不同突变位点对酶催化活力提升的贡献;采用计算生物学方法,对野生型 WecE 和最优突变体 VarB 与中间产物相互作用进行了分子动力学模拟,结合突变体氨基酸性质分 析,对突变体催化活力提升的分子机制进行了解析。

## 2.2 实验材料

2.2.1 菌株

大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3)pET28a(+)-WecE: 实验室保存 大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3)pET28a(+)-Y321F: 实验室保存 大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3)pET28a(+)-VarA: 实验室保存 大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3)pET28a(+)-VarB: 实验室保存 2.2.2 实验材料与试剂 本章节主要使用试剂见表 2-1

表 2-1 实验试剂表

	生产厂家
	上海生工生物工程公司
胰蛋白胨	英国 Oxiod 公司
酵母提取物	英国 Oxiod 公司
氯化钠	上海凌峰化学试剂有限公司
井冈霉烯酮	药明康德公司
磷酸吡哆醛 (PLP)	阿拉丁公司
L-谷氨酸	上海生工生物工程公司
L-谷氨酸脱氢酶(L-GDH)	Sigma 公司
还原型辅酶I二钠(NADH)	阿拉丁公司
咪唑	上海生工生物工程有限公司

其他常用化学试剂均为分析纯,主要从上海凌峰化学试剂有限公司、国药集团化学试剂 有限公司、和阿拉丁试剂有限公司进行购买。

2.2.3 主要培养基及缓冲试剂配制

(1) LB 培养基(g/L):分别称取 10g 蛋白胨,5g 酵母粉,10g 氯化钠,加入去离子水 溶解后定容至 1L。在 121℃条件下灭菌 20min,配制 LB 固体培养基时,在上述培养基的基

上海交通大学 Shanghai liao Tong University

础上加入 2%(w/v)琼脂粉。

(2)自动诱导培养基(g/L):分别称取 10g 蛋白胨,5g 酵母粉,随后加入 20ml 50×M 组 分溶液,20ml 50×5052 组分溶液以及 2ml 1M MgSO4 溶液,加入去离子水混合均匀后定容 至 1L。在 115℃条件下灭菌 30min。

(a) 50×M 组分:分别称取 89.94g 十二水合磷酸氢二钠,34g 磷酸二氢钾,26.75g 氯 化铵和 7.1g 硫酸钠,加入去离子水溶解后定容至 200mL。在 121℃条件下灭菌 20 min。

(b) 50×5052 组分:量取 75mL 甘油,称取 6.25g 葡萄糖和 25g α-乳糖,加入 100mL 去离子水并且加热,直至乳糖完全溶解,再加入去离子水定容至 250mL。在 115℃条件下灭 菌 15min。

(3) Binding buffer (PBS 缓冲液) (20mM, pH7.5): 分别量取 60mL 5M NaCl 溶液,
 80mL PBS 母液,加入去离子水定容至 2L。使用 0.22μm 水系滤膜抽滤过膜。

(a) 5M NaCl 溶液:称取 292.2g NaCl,加去离子水溶解后定容至 1L。

(b) PBS 母液: A 液: 称取 125.35g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 加入 700ml 去离子水溶解; B 液: 称取 23.4g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 加入 300ml 去离子水溶解。一边搅拌一边将 B 液缓缓加入 到 A 液中,直至体系 pH 至 7.5,得到 pH 为 7.5 的 PBS 母液。

2.2.4 实验器材

本章节使用主要仪器见表 2-2.

表 2-2 本节实验主要使用仪器

仪器名称	生产厂家
超净工作台	苏净集团•苏州安泰空气技术有限公司
高压灭菌锅	日本 SANYO 公司
高压细胞破碎机	上海永联生物科技公司
小型高速离心机	德国 Eppendorf 公司
高速冷冻离心机	日本 HITACHI 公司
移液器	德国 Eppendorf 公司
多通道移液器	德国 Eppendorf 公司
酶标仪	美国 Molecular Device 公司
96 孔板振荡器	德国 IKA 公司
96 孔深孔板	上海生工生物工程公司
96 孔浅孔板	广州洁特公司
恒温水浴锅	宁波新芝生物科技股份有限公司
恒温培养箱	广州永程实验仪器公司
Innova 摇床	德国 New Brunswick Scientific 公司

## 2.3 实验方法

2.3.1 目标蛋白的诱导表达

(1) 将四种含有目标基因 WecE、Y321F、VarA、VarB 的表达菌株大肠杆菌 BL21(DE3) 分别取 5µl 接种于 5ml LB 培养基中,加入终浓度为 0.1mg/ml 卡那霉素进行选择培养。37℃ 条件下震荡培养 12~14h,活化菌种。

(2) 诱导表达

(a)自动诱导表达:将活化好的菌株接种于 1L 自动诱导培养基中,加入终浓度为 0.1mg/ml 卡那霉素,在 37℃,220rpm 条件下培养 2~4h。测定菌液 OD 值为 0.6 左右时,改 变温度至 25℃,220rpm 条件下诱导表达 20h 左右。

(b) IPTG 诱导表达:将活化好的菌株接种于 1LLB 培养基中,加入终浓度为 0.1mg/ml



卡那霉素,在 37℃,220rpm 条件下培养 2~4h。测定菌液 OD 值为 0.6 左右时,加入终浓度 为 0.1mg/ml IPTG 诱导表达,在 25℃,220rpm 条件下继续培养 20h 左右。

2.3.2 目标蛋白的纯化

(1) 收集菌体:将菌液分别收集至离心桶中,在 6000rpm,4℃条件下离心 20min,弃 去上清。分别加入 40ml Binding Buffer,加入转子在磁旋仪上重悬菌体。菌体需要重悬均匀, 若含有较大的菌体成团或颗粒,破碎时则有可能堵塞高压破碎机管路。

(2) 利用高压细胞破碎机破碎菌体:

(a) 实验前打开制冷器,以及循环泵系统,将整个管路预冷至4℃。

(b)由于管路不能在空液状态下加压运行,因此松弛加压手柄,压力表读书为0后,将管路排空,以此用去离子水、20%乙醇、去离子水以及 Binding buffer 将管路及进料杯清洗,并在进料杯中加入三分之一到二分之一容量的清洗液或缓冲液,加 100bar 左右低压。洗清管路。

(c) 空压状态下排空管路,闭合液体循环管路,加入重悬后的菌体,转动加压手柄, 缓慢将压力增加至 600~800bar,破碎 2~3min。缓慢降低压力至空压,收集破碎液并冰浴放置。

(d)破碎不同菌体之间,按照步骤(b)清洗管路。全部破碎完毕后,以此用去离子水、 20%乙醇、去离子水清洗管路,之后用去离子水将进料杯加满,液封管路。

(e)细胞破碎液在 10000rpm~12000rpm, 4℃条件下离心 30min,收集上清液。以相同 条件重复离心或用 0.22μm 水系滤膜过膜上清液。获得上柱用粗酶液。

(3) Ni 柱亲和纯化:由于构建的质粒 pET28a 中带有 6×His 标签,因此可用镍柱亲和 层析的方法纯化目标蛋白,纯化具体步骤如下:

(a) 将 Ni 柱中 change buffer 预留液放空。

(b) 使用 20 倍柱体积超纯水I冲洗 Ni 柱。

(c) 使用 20 倍柱体积 binding buffer 平衡 Ni 柱。

(d) 粗酶中加入 400µl 1M 咪唑, 混合均匀。

(e)粗酶液分多次挂柱,防止酶液在室温下活力降低。收集第一次挂住后的粗酶液, 重复挂柱一次。

(f) 使用 60 倍柱体积 50mM 咪唑冲洗杂蛋白。

(g) 使用 10 倍柱体积 200mM 咪唑洗脱目的蛋白,前三滴洗脱液舍去,之后的洗脱液 分管收集,每管 2ml。用 Nanodrop2000 粗测每管收集液中的蛋白浓度, Binding buffer 为 Blank,保留较高浓度的收集液用于后续实验。

(h) 使用 10 倍柱体积 500mM 咪唑冲洗 Ni 柱,除去 Ni 柱上的所有蛋白。

(i) 使用 30 倍柱体积 binding buffer 平衡 Ni 柱。

(j) 使用 10 倍柱体积 strip buffer,除去葡聚糖填料上的 Ni 离子。

(k) 使用 30 倍柱体积超纯水I冲洗 Ni 柱。

(1)使用 5 倍柱体积 change buffer 还原 Ni 柱,保留部分 change buffer 液封 Ni 柱,保存于 4℃条件下。长期保存可用 20%乙醇液封。

(4)蛋白透析:半透膜透析袋在去离子水中加热煮沸两次,之后使用去离子水清洗, 并捡漏。选取蛋白浓度较高的 7~8 管收集液,装入半透膜透析袋中,两端使用止水夹密封。 将透析袋放入 2L binding buffer 中,在磁悬搅拌,4℃条件下透析除去咪唑。4h 后,更换透 析液二次透析过夜。

(5) 蛋白质浓度测定:使用 Bradford 法测定。具体步骤如下:

(a)用 binding buffer 将蛋白标准品(1mg/mL)稀释至 0 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.8 mg/mL, 1.0 mg/mL。



(b) 根据 Nanodrop2000 粗测蛋白样品的浓度, 使用 binding buffer 稀释至 0~1mg/mL。

(c)每个待测样品设置三组平行,取 20µL 标准品和 20µL 稀释后的待测样品加至含 有 200µL Bradford 工作液的 96 孔板中,混合均匀。

(d)使用酶标仪在 595nm 处检测吸光值,根据标准样品吸光值计算标准曲线,进而计算出待测蛋白浓度。

2.3.3 酶动力学参数测定

由于井冈霉烯胺无紫外和荧光信号,因此将转氨反应与 L-GDH 催化反应偶联,在酶标 仪下检测 NADH 信号值。

(1) 酶促反应体系:按表 2-3 所示添加反应体系,反应总体积为 100μl。每个底物浓度 梯度设置三组平行,将除酶液外的所有溶剂加入 96 孔板后,轻微震荡使其完全混匀。同时 需要保证各个孔内没有气泡出现,否则会干扰紫外信号测定。

(2) 酶标仪信号测定:将酶标仪预热至 37℃后,向 96 孔板中快速平稳加入酶液,防止气泡产生,立即放入酶标仪中检测。在 340nm 波长处检测 30min,每 30s 间隔读取一次数据,初始检测开始前震荡 5~10s,保证溶液混合均匀。

	· PC = 0 A4	
	试剂	终浓度
	L-GDH	0.4U
偶联反应	NADH	0.5mM
	NH <sub>4</sub> Cl	5mM
	Glutamine	5mM
转氨反应	PLP	3μΜ
	Enzyme	0.85mg/ml
		0.01mM
		0.02 mM
		0.03 mM
		0.04 mM
		0.05 mM
	Valienone	0.1 mM
底物梯度		0.25 mM
		0.5 mM
	valienone	0.75 mM
		1 mM
		1.25 mM
		1.5 mM
		3 mM
		2.5 mM
		3.5 mM
		5 mM
Buffer	PBS (pH7.5)	20mM

表 2-3 酶促反应体系

(3) NADH 信号被酶标仪检测, 在反应过程中 NADH 不断被消耗, 从而显示出该反应的进行速率。得到酶反应吸光值曲线后, 选取曲线上线性部分求斜率, 可得到吸光值随时间变化的速率 (Abs/min)。根据计算反应速率的总公式为: V(U/mg)=[(Abs/min)\*100]/(6220\*0.29\*mg of enzyme)。

(4)将底物浓度作为X轴数据来源,将相应的反应速率V作为Y轴数据来源,在 origin



软件中,使用米氏方程函数得到酶活动力学曲线以及酶动力学参数:fitting——Nonlinear fitting——Growth——MichaelisMenten.

## 2.3.4 分子动力学模拟

由于突变体VarB的蛋白晶体结构未知,我们首先使用WecE的晶体结构为模板,通过同 源建模的方法获得突变体蛋白结构模型。在Swiss Model网站上提交突变体VarB的氨基酸序 列,以WecE(4ZAH)晶体结构为模板,进行高级结构模型构建。采用Autodock软件将获 得的结构模型与井冈霉烯酮催化反应理论中间体进行分子对接。将WecE与VarB晶体结构进 行预先结构最优化(Optimize),能量最小化(Minimize)之后,选取活性结合口袋;将空间构 象最优化的底物分子PMP-Valienone以空间位置最优化形态对接于WecE野生型晶体结构和 VarB结构模型的活性口袋中;将蛋白-底物复合物晶体进行去水等预处理后,在模拟软件中 加载CHARMM力场,添加溶剂化水盒子,保持体系电荷平衡,以最小化能量下的平衡结 构,使用GROMACS(version 2019.3)软件进行100ns的分子动力学模拟,并利用RMSD分子 蛋白与底物之间的作用与距离。

## 2.4 结果与讨论

#### 2.4.1 候选酶的表达与纯化

野生型氨基转移酶 WecE 及其三个优秀突变体 Y321F、VarA 和 VarB 采用大肠杆菌 BL21 (DE3)表达,经镍柱亲和层析法纯化出的蛋白浓度如表 2-4 所示。在后续酶促反应中,酶 终浓度需要达到 0.85mg/ml,以 1L 培养基培养菌体得到的蛋白浓度可以达到使用要求。然 而在后续透析过程中发现,当酶液浓度过高时,如 WecE 与 Y321F,酶液中会有蛋白质析出, 使得酶液实际浓度下降,酶活性降低。此外,当酶进行-80℃反复冻融后,其活性大大将降 低,保证实验结果的准确,应尽量避免将酶液反复冻融使用,实际进行实验时,可将蛋白溶 液分管保存,每管 50μl 酶液。

目标酶		浓度(1	mg/ml)		平均浓度(mg/ml)
WecE	10.597	16.933	7.234	5.144	$9.977 \pm 4.462$
Y321F	5.778	26.625	25.888	11.900	$17.548 \pm 8.977$
VarA	2.833	14.895	14.808	5.849	$9.596 \pm 5.362$
VarB	3.217	12.525	21.617	14.743	13.026±6.581

表 2-4 蛋白纯化结果

2.4.2 酶动力学参数测定

采用 L-谷氨酸偶联与转氨反应偶联法对野生型氨基转移酶 WecE 及其三个优秀突变体 Y321F、VarA 和 VarB 的酶反应动力学参数进行了测定。利用 Origin 软件对测得的酶反应速 率与底物浓度关系数据进行处理,根据米氏方程曲线得到各个转氨酶的动力学曲线,如图 2-1 所示。







从图中可以看出,每条曲线上的有效数据点集中于曲线由指数增长期转向平台期的过度 阶段,对应低浓度底物梯度区间,总体曲线拟合效果较好。同时,相比于 WecE,突变体 VarB、 VarA 和 Y321F 曲线上的 V<sub>max</sub>值均有所增大,且突变体 VarB 拥有最大 V<sub>max</sub>值。由曲线参数 可进一步计算得到野生型与突变体酶的动力学参数,见表 2-5。根据表中数据可以看出,各 个突变体酶的 K<sub>m</sub>值均有所下降,其催化效率相比于野生型 WecE 均有所提升。并且随着迭 代突变次数增多,突变氨基酸位点迭加,突变体催化效率逐步提升,氨基酸位点的突变对于 转氨酶活性提升具有累加效应,这提示突变氨基酸对酶的活力提升机理可能相似,具体催化 活性提升机制的研究将在 2.4.3 中展开。从最终的结果来看,突变体 VarB 催化效率提升最 多,相较于野生型 WecE 提高了 19.18 倍。

Mutant	Mutations	$K_{\rm m}$ (mM)	$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_{\rm m} ({ m mM}^{-1} \cdot { m min}^{-1})$	Fold change over WT
WT	-	0.133±0.002	0.012±0.003	0.090±0.021	1
Y321F	Y321F	0.092±0.009	0.025±0.002	0.272±0.044	3.02
VarA	Y321F/V318R	0.099±0.005	$0.065 \pm 0.004$	0.657±0.022	7.29
VarB	Y321F/V318R/F319V	$0.062 \pm 0.002$	0.107±0.003	1.726±0.008	19.18

表 2-5	酶动力学参数测定结果	
10 4-5	时的力士多数例足扣不	

在实际实验中,移液器批量吸取酶液时容易出现气泡,在移液枪内保留一点余液,一方 面可保证最终酶浓度相同,另一方面可避免气泡生成;加酶顺序对结果也有一定影响,一次 加样涵盖同一底物浓度下的所有平行样最终可能导致该浓度下的数据不够准确,因此一次加 样应该涵盖多个浓度。总之,由于动力学测定时实验组较多,在进行检测时,需要尽量保证 各实验组之间变量之外的条件相同,减少实验误差,这对于后续数据处理和分析非常重要。

其次,在进行数据处理时发现,反应时间过长时,酶标仪测得的转氨反应速率数据开始 出现大幅度波动,这可能是由于酶标仪长时间以 37℃运行会对检测结果造成影响。在初步

第 14 页 共 31 页



测定动力学参数时,有效数据点均匀分散于整条曲线上会导致拟合方差 R<sup>2</sup>较大。因此实验 组需包含较多的低浓度底物梯度,以保证拟合曲线的准确性。此外,酶液经纯化冷冻保存后 检测得出的数据质量下降明显。因此,本项目中,对四种转氨酶进行了多次酶动力学参数测 定,并尽量避免酶液的长时间保存。最终得到的不同组之间的检测结果相似,保证实验结果 的准确性。

#### 2.4.3 催化活力提升的机制分析

为了探索突变体酶活力提升的机制,我们采用计算生物学分子动力学模拟方法,对氨基转移酶 WecE 和最优突变体 VarB 与其理论反应中间体 PMP-井冈霉烯酮的结合位点与相互 作用进行了分析。从蛋白质高级结构来看,发生提升突变的三个氨基酸,均位于野生型 WecE 和突变体 VarB 的 Loop9。Loop9 位于 WecE 和 VarB 底物结合通道的入口,通过氨基酸生化 性质分析,Y321F 位点的突变,使得原本酪氨酸残基中的羟基替换为苯丙氨酸残基中的氢原 子,原本的亲水作用转变为疏水作用;F319V 位点的突变,造成了原本提供疏水作用力的苯 丙氨酸转化为提供范德华力的缬氨酸,使得底物中间体与 Loop9 之间的相互作用减弱;此 外,V318R 位点的突变,使得精氨酸在原有位点上增加了更多的侧脸和正电基团,增加空间 位阻的同时,也使得底物中间体与 Loop9 之间的静电作用力增大。综合以上三个提升位点氨 基酸性质的变化,突变体 VarB 的关键氨基酸残基的突变,使得底物中间体与 Loop9 之间的



图 2-2 WecE 与 VarB 与反应中间体相互作用分子动力学稳定状态分析

在分子动力学模拟中,WecE 与 VarB 与反应中间体相互作用分子动力学稳定状态分析 也证实了这一点(图 2-2)。从图像上我们可以看到,Loop9 位于底物口袋边缘,处于活性中 心位点赖氨酸 Lys181 的相对方向。分子动力学模拟稳态取向显示,相比于野生型 WecE,突 变体 VarB 的底物中间体与活性赖氨酸之间的距离从 6.3 Å 缩短到了 5.2 Å,使得反应中间体 更加接近活性中心;这与氨基酸性质分析得到的 Loop9 与中间体作用减弱的结论一致,是突 变体活力提升的主要原因。



# 第三章 候选氨基转移酶立体选择性机制分析

## 3.1 引言

前期研究中,实验室利用井冈霉素生物合成途径中的中间产物井冈霉烯酮为底物,设计 了由异源氨基转移酶生物合成井冈霉烯胺的人工设计途径。对候选氨基转移酶的筛选发现, 氨基转移酶 WecE 和 BtrR 识别并催化非天然底物井冈霉烯酮,立体特异性的生成井冈霉烯 胺和 β-井冈霉烯胺(e.e.>99.9%),而氨基转移酶 ArnB 则催化井冈霉烯酮生成井冈霉烯胺和 β-井冈霉烯胺的混合产物。

本研究根据氨基转移酶催化机理,将理论中间产物 PMP-井冈霉烯酮配体分子与氨基转移酶蛋白晶体 WecE(4ZAH)、BtrR(5W71)和 ArnB(1MDO)的晶体结构出发<sup>[38][39][40]</sup>进行对接,比对底物与酶蛋白结合方式之间的差异,分析其催化特异性产生的分子机制,为之后寻找特定氨基转移酶实现糖胺类化合物不对称手性设计合成奠定基础。

## 3.2 材料与工具

3.2.1 蛋白晶体结构检索

在 Protein Data Bank 中以酶名称为关键词检索 WecE、BtrR 以及 ArnB 的晶体结构,并 整理分析检索到的晶体结构天然配体信息,方便之后进行分子对接模拟以及结构比对,也适 用于分析酶与底物的相互作用分析参考。

3.2.2 同源建模

由于突变体 VarB 的蛋白晶体结构未知,因此首先需要通过同源建模的方法获得突变体蛋白 晶体结构。由于 VarB 与 WecE 的氨基酸序列高度同源,因此可以使用 WecE 的晶体模型为 模板,进行晶体模型建立。在 Swiss Model 网站上提交突变体 VarB 的氨基酸序列,以 WecE(4ZAH)晶体结构为模板,进行空间结构预测。建模成功的结果保存为 PDB 文件,用于 之后的分子对接以及结构分析比对。

3.2.3 分子对接

以 PMP-Valienone 为配体,以及糖氨基转移酶晶体结构为蛋白受体,通过 Discovery Studio 3.5 中的 CDOCKER 方法将两个分子进行对接模拟。对预处理蛋白晶体结构应先进行 结构最优化(Optimize),能量最小化(Minimize)。之后选取活性位点将分子配体对接于活性口 袋中,然后以默认参数开始对接。对接中,小分子应以空间构象最优化以及空间位置最优化 形态与酶晶体受体对接。

在结果中应以催化机理作为蛋白-底物复合物构象的是否合理的判断依据,同时报告中的 CDCKER ENERGY 值作为复合物合理性的参考,分值越高代表复合物的构象能量越低,模拟效果越好。由此选择出最佳的复合物构象用于后续分析。

3.2.4 结构对比

利用 Pymol 中的 Align 功能或 Discovery Studio 3.5 中的 Align by structure similarity 功能,将两个酶-底物复合物进空间结构对比,结合之前报道的底物与相互作用方式,从中筛选出配体与酶相互结合的作用分子位点,作为深入理解氨基转移酶催化活性差异以及立体选择性机理的指导依据。



## 3.3 结果与讨论

在 Protein Data Bank 中进行检索后,三种糖氨基转移酶的晶体结构报道信息见表 3-1 所示。其中 WecE 有 4PIW 与 4ZAH 两种文献报道的晶体结构,WecE 与磷酸比吡哆醛配体形成内醛亚胺型晶体结构为 4PIW,与天然底物 TDP-4-氨基-4,6-双脱氧半乳糖形成晶体结构为 4ZAH。为之后研究底物与酶之间的相互作用关系,之后将选取 4ZAH 进行底物分子的对接模拟以及结构比较。相同地,BtrR 晶体结构中 5W71 晶体进行底物分子与酶模拟对接将为准确,ArnB 则选取 1MDO 进行观察对比。

	衣 3-1 二州 楣 氨 基 节 侈 呣 前 净 笻 杓 恒 忌					
酶	产物构型	晶体序列	肽链数	主要结合分子		
WecE	α-井冈霉烯醇	4PIW 4ZAH 4ZAS(CalS13 酶) 6BLG	八聚体 八聚体 六聚体 单体	LLP 1,2-乙二醇 2-(N-甲氧基)-乙磺酸		
BtrR	β-井冈霉烯醇	2C7T 2C81 5W71	二聚体 单体 二聚体	PLP PMP		
ArnB	α+β	1MDO 1MDX 1MDZ 4OCA 5A8J 5A8I 4LC3	单体 单体 单体 单体 单体 二聚体	PLP PMP 2-氧代葡萄糖酸 甘油 柠檬酸 甘油 1,2-乙二醇		

## 表 3-1 三种糖氨基转移酶晶体结构信息

3.3.1 立体选择性机制分析

根据底物分子与蛋白晶体结合方式的不同,可以获得两种分子结合构象。将三种酶-复 合物进行逐一静态结构对比后,可以通过 RMSD 值来判断两者之间的静态差异。RMSD 是 一种均方根偏差,是指两个目标构象之间的偏差统计。两个目标构象经过平移和转动之后, 尽量与初始结构重合或部分重合,之后计算每个原子的空间坐标与初始目标构象的差值,再 计算这些差值的平方的平均数,开方后得到 RMSD 值。它可以反应两个构象之间的差异大 小,数值越接近 0 代表两者之间相差越小,当 RMSD 值=0 时,两者完全重合。通过静态分 析可以得到三种糖氨基转移酶-底物复合物之间的差异如表 3-2 所示。

表 3-2 三种复合物 RMSD 值对比			
复合物对比	RMSD		
WecE vs BtrR	1.733		
WecE vs ArnB	1.490		
BtrR vs ArnB	1.800		

从对比结果来看,WecE 与 BtrR 的立体选择性差异较大,并且其 RMSD 也相对较大, 但是其活性中心位置大致相似(见图 3-1)。此外,在这些蛋白结构的研究中,辅因子一般为 PMP 或者 PLP,它们与氨基转移酶的结合方式大致相似,但是与结合相关的具体氨基酸残 基有不同差异。此外与辅因子关键吡啶环和氮原子结合的保守氨基酸残基也有所不同。活性 位点的氨基酸残基在 WecE, BtrR, ArnB 中保守(Lsy181-WecE; Lys192-BtrR; Lys188-ArnB)。



活性位点的结合方式以及周围氨基酸残基提供的稳定力导致了中间体醛亚胺或者底物糖有 不同的翻转角,进而在完成转氨反应时出现不同的立体选择性。



#### 图 3-1 氨基转移酶 WecE、BtrR 活性中心对比分析 Red-WecE; Blue-BtrR

值得一提的是,在以 TDP 衍生物为底物时,WecE 会出现"碱基翻转"从而使得中间体 醛亚胺中的 N 在垂直糖平面方向上连接,从而使产物出现 R 型构象。其他转氨酶家族在催 化生成 S 型构象底物时,醛亚胺中的 N 因糖平面的翻转而在平行方向上进行连接。而在 BtrR 晶体结构中取决于配体为 PLP/PMP, Trp92 绕 Cα-Cβ 旋转 45°,辅因子朝向 Trp92 翻转 30°; Asp163 远离辅因子翻转 15°。这些可能是 WecE 与 BtrR 在催化过程中产生不同空间构象产 物的影响因素之一。

具体将各个晶体模型中的活性位点及关键氨基酸残基作用总结见表 3-3。从表中我们也 可以看到,在关键活性赖氨酸上,三种氨基转移酶相对保守,并且活性赖氨酸周围的氨基酸 残基也具有一定的保守性。推测这可能是由于在这三种氨基转移酶中,活性位点并没有很大 差异,造成立体选择性不同的原因可能是底物中间体空间取向或构型的不同。以立体选择性 相差较大的 WecE 与 BtrR 进行比对,结果如图 3-3 所示。可以看到,在两者的空间结构中, 活性赖氨酸的空间位置重合度较高,并且两者的空间取向较为接近,而非天然底物中间体上 的吡喃环结构(即井冈霉烯酮残基)在空间位置上相似,但结构取向不同。因此我们推测在 实际底物中间体形成过程中,井冈霉烯酮与配体分子 PMP 结合形成西夫碱中间体的方式有 E 型与 Z 型两种不同取向,之后在与活性赖氨酸反应完成转氨过程时,形成α与β两种不同 构型。



表 3-3 晶体结构与配体或底物相互作用位点

转氨酶 底物	WecE	BtrR	ArnB	
PLP-internal aldimine	Lys181			
PLP-pyridinium ring and C6 methyl	Phe81, Val126			
PLP-C5-OH	Gln155, Tyr321			
PLP-N1-N	Asp152, Thr84			
PLP-phosphate	Cys55, Thr56, Ser176, Ser232		Gly195, Glu194 (water bridge)	
PLP hydrogen bonds		Gly66, Ser67, Asp163, Gln166, Ser187, Lys192		
PMP-phosphate-O1P		Ser67( a 3), H2O	Thr64, Ser183	
PMP-pyrimidine		Asp163 (β10)	Trp89, Asp160(- Nitrogen)	
PMP-O3		Gln166	His163( salt bridge)	
PMP Hydrophobic		Trp92, Val137, Ala94,		
interactions		Leu70, Ala165		
Nucleotide sugar	L7 (residues Arg213– Thr225), L9 (residues Val318–Ile322)			
Nucleotide sugar- thymidine-O4, N3	Tyr224 (L7)			
Nucleotide sugar- thymidine-N3	L7 Tyr224			
Nucleotide sugar- pyranose-O2, O3	His320 (loop L9)			
UDP-L-			Pro16, Ala186, Ile187,	
Ara4O(substrate)- Uracil			Trp34	
UDP-L-Ara4O(substrate)			His 185( $\beta$ ) His 320( $\alpha$ )	
-phosphate			1115105( P ), 1116525( <sup>u</sup> )	
Other Amino acid residues		Val137 Ser187	His329, Phe330, Lys 188	





## 图 3-2 WecE 与 BtrR 底物中间体-活性中心赖氨酸作用分析与立体选择性形成机制 A: 底物中间体与酶活性中心结合取向; B: 酶催化立体选择性差异分析

本章中对三种不同立体选择性的氨基转移酶进行了非天然底物分子对接,对比其活性中 心以及底物中间体作用模型,提出了由西夫碱中间体顺反异构引起糖环翻转,产生不同氨基 构型产物的立体选择性机制;突破了氨基转移酶底物识别的传统认知,证实该氨基转移酶家 族成员可以直接识别无 NDP 或磷酸化修饰的吡喃糖环;为依据合成生物学理念,采用氨基 转移酶直接识别吡喃糖羰基前体合成功能糖胺奠定了重要的理论基础在之后进一步应用氨 基转移酶进行不对称手性合成中具有重要作用。



## 第四章 候选氨基转移酶非天然底物催化能力探究

#### 4.1 引言

除井冈霉烯胺、β-井冈霉烯胺等 C<sub>7</sub>N 假糖胺类化合物,D-葡萄糖胺,D-喹诺酮胺,D-半乳糖胺,D-甘露糖胺等功能性糖胺也具有重要的医药及应用价值。异源氨基转移酶识别非 天然底物井冈霉烯酮生成井冈霉烯胺和 β-井冈霉烯胺的反应特征,以及本论文对氨基转移 酶底物识别机制研究,揭示了活性中心关键氨基酸与非天然底物的作用机制,突破了氨基转 移酶底物识别的传统认知,证实该氨基转移酶家族成员可以直接识别无 NDP 或磷酸化修饰 的吡喃糖环;为依据合成生物学理念,采用氨基转移酶直接识别吡喃糖胺羰基前体化合物奠 定了重要的元件和理论基础。

为了探讨异源糖氨基转移酶对功能性糖胺羰基前体的催化能力,本研究通过目标分子 "逆向分解,正向合成"的原则,推测了功能糖胺的潜在羰基底物,如肌醇单酮,L-甘露糖 酸,葡萄酸内脂等。并采用了邻苯二甲醛(o-Phthalaldehyde,OPA)柱前在线延生化的方法,对 候选氨基转移酶 WecE 和 BtrR 催化识别潜在底物,完成从酮羰基到氨基转化的产物进行评 价<sup>[23][41]</sup>。

OPA 衍生化是指,在 2-巯基乙醇存在的条件下,OPA 与伯胺反应生成 1-硫代-2 烷基异 吲哚,该产物产生荧光,并且在紫外区具有较强的吸收,既可以做高灵敏度荧光检测,也可 以做一般的紫外吸收检测。具体原理见图 4-1.



图 4-1 OPA 衍生化检测井冈霉烯胺和 β-井冈霉烯胺原理

#### 4.2 实验材料

4.2.1 菌株

大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3)pET28a(+)-WecE: 实验室保存 大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3)pET28a(+)-BtrR: 实验室保存 大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3)pET28a(+)-ArnB: 实验室保存 大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3)pET28a(+)-VarK: 实验室保存 4.2.2 实验材料与试剂 本章节主要使用试剂见表 4-1 及表 2-1



农 +1 平阜 1 王安区市 叭刑			
试剂名称	生产厂家		
邻苯二甲醛(OPA)(HPLC 用)	Sigma 公司		
L-谷氨酰胺	阿拉丁公司		
咪唑	上海生工生物工程有限公司		
硼酸	国药集团化学试剂有限公司		
甲醇(HPLC 用)	上海安谱实验室科技股份有限公司		
乙腈(HPLC 用)	上海安谱实验室科技股份有限公司		
β-巯基乙醇	北京百灵威科技有限公司		

表 4-1 本章节主要使用试剂

4.2.3 主要培养基及试剂配制

(1) LB 培养基: 见上一章节 2.2.3.

(2) 自动诱导培养基:见上一章节 2.2.3.

(3) 蛋白质纯化缓冲液:

(a) Binding buffer (PBS 缓冲液)(20mM,pH7.5):分别量取 60mL5M NaCl 溶液,80mL PBS 母液,加入去离子水定容至 2L。使用 0.22µm 水系滤膜抽滤过膜。

(b) 称取 68g 咪唑,加入去离子水溶解后,定容至 1L,终浓度为 1mol/L

(c) 50mM 咪唑:用 PBS 缓冲液将 1M 咪唑稀释至终浓度为 50mM

(d) 200mM 咪唑: 用 PBS 缓冲液将 1M 咪唑稀释至终浓度为 200mM

(e) 500mM 咪唑: 用 PBS 缓冲液将 1M 咪唑稀释至终浓度为 500mM

(f) Strip buffer:用超纯水I将 4×Strip buffer 稀释 4 倍

(g) change buffer: 用超纯水I将 8×Strip buffer 稀释 8 倍

(4) 0.4M Borate buffer(pH=9.0): 2.48g 硼酸用 100mL 超纯水 I 溶解,加入 NaOH 调 pH 至 9.0, 0.22μm 滤膜过滤,室温保存。

(5) 柱前衍生化试剂 OPA: 称取 20mg 邻苯二甲醛,加入 900μL 甲醇溶解。再加入 100μL Borate buffer 与 16μL β-巯基乙醇,振荡混匀。0.22μm 有机滤膜过滤,现配现用。

4.2.4 实验器材

本节所用实验仪器见表 4-2 以及表 2-2

表 4-2 本节主要使用仪器			
仪器名称	生产厂家		
1260 Infinity 高效液相色谱	美国 Agilent 公司		
Eclipse XDB-C18 反向色谱柱	美国 Agilent 公司		

#### 4.3 实验方法

4.3.1 蛋白表达

(1) 将四种含有目标基因 ArnB, BtrR, VarK, WecE 的表达菌株大肠杆菌 BL21(DE3)分 别取 5µl 接种于 5ml LB 培养基中,加入终浓度为 0.1mg/ml 卡那霉素进行选择培养 37℃条 件下震荡培养 12~14h,活化菌种。

(2)诱导表达:将活化好的菌株接种于 1L LB 培养基中,加入终浓度为 0.1mg/ml 卡 那霉素,在 37℃,220rpm 条件下培养 2~4h。测定菌液 OD 值为 0.6 左右时,加入终浓度为 0.1mg/ml IPTG 诱导表达,在 25℃,220rpm 条件下继续培养 20h 左右。

4.3.2 目标蛋白的纯化

(1) 收集菌体:将菌液分别收集至离心桶中,在6000rpm,4℃条件下离心 20min,弃

と海交通大学
SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY

去上清。分别加入 40ml Binding Buffer, 加入转子在磁旋仪上重悬菌体。菌体需要重悬均匀, 若含有较大的菌体成团或颗粒, 破碎时则有可能堵塞高压破碎机管路。

(2)利用高压细胞破碎机破碎菌体:

(a)实验前打开制冷器,以及循环泵系统,将整个管路预冷至4℃。

(b)由于管路不能在空液状态下加压运行,因此松弛加压手柄,压力表读书为0后,将管路排空,以此用去离子水、20%乙醇、去离子水以及 Binding buffer 将管路及进料杯清洗,并在进料杯中加入三分之一到二分之一容量的清洗液或缓冲液,加 100bar 左右低压。洗清管路。

(c) 空压状态下排空管路,闭合液体循环管路,加入重悬后的菌体,转动加压手柄, 缓慢将压力增加至 600~800bar,破碎 2~3min。缓慢降低压力至空压,收集破碎液并冰浴放置。

(d)破碎不同菌体之间,按照步骤(b)清洗管路。全部破碎完毕后,以此用去离子水、 20%乙醇、去离子水清洗管路,之后用去离子水将进料杯加满,液封管路。

(e)细胞破碎液在 10000rpm~12000rpm, 4℃条件下离心 30min,收集上清液。以相同 条件重复离心或用 0.22μm 水系滤膜过膜上清液。获得上柱用粗酶液。

(3) Ni 柱亲和纯化:由于构建的质粒 pET28a 中带有 6×His 标签,因此可用镍柱亲和 层析的方法纯化目标蛋白,纯化具体步骤如下:

(a) 将 Ni 柱中 change buffer 预留液放空。

(b) 使用 20 倍柱体积超纯水I冲洗 Ni 柱。

(c) 使用 20 倍柱体积 binding buffer 平衡 Ni 柱。

(d) 粗酶中加入 400µl 1M 咪唑, 混合均匀。

(e)粗酶液分多次挂柱,防止酶液在室温下活力降低。收集第一次挂住后的粗酶液, 重复挂柱一次。

(f)使用 60 倍柱体积 50mM 咪唑冲洗杂蛋白。

(g)使用 10 倍柱体积 200mM 咪唑洗脱目的蛋白,前三滴洗脱液舍去,之后的洗脱液 分管收集,每管 2ml。用 Nanodrop2000 粗测每管收集液中的蛋白浓度,Binding buffer 为 Blank,保留较高浓度的收集液用于后续实验。

(h) 使用 10 倍柱体积 500mM 咪唑冲洗 Ni 柱, 除去 Ni 柱上的所有蛋白。

(i) 使用 30 倍柱体积 binding buffer 平衡 Ni 柱。

(j) 使用 10 倍柱体积 strip buffer , 除去葡聚糖填料上的 Ni 离子。

(k) 使用 30 倍柱体积超纯水I冲洗 Ni 柱。

(1)使用 5 倍柱体积 change buffer 还原 Ni 柱,保留部分 change buffer 液封 Ni 柱,保存于 4℃条件下。长期保存可用 20%乙醇液封。

(4) 蛋白浓缩:

(a)根据蛋白分子质量,选取分子截流量为 3000D 的浓缩管,加满超纯水I,在 2000rcf, 4℃条件下离心 10min,清洗浓缩管。离心时,半透膜方向与转子轴心保持垂直。

(b)将浓度最高的 7~8 管蛋白液倒入浓缩管中,在 2000rcf,4℃条件下离心 30min。 取 10µl 流穿液加入 100µl Brandford 中,以 10µl Binding buffer 缓冲液为空白对照,检测 Brandfor 是否变蓝。若流穿液没有变蓝则表示蛋白漏出。

(c)检漏后的浓缩管中加入 Binding buffer 至 15ml 刻度线,在 2000rcf,4℃条件下离 心 30min,浓缩除盐。检漏流穿液。

(d)重复选取步骤(c),浓缩除盐两次。浓缩后的蛋白液体进行浓度测定后,每管 50µl 分装,-80℃冻存。

(e)浓缩管用去离子水充分清洗,再用 Binding buffer 充分清洗,使用 20%乙醇液封保



存。

(5) 蛋白质浓度测定:使用 Bradford 法测定。具体步骤如下:

(a)用 Binding buffer 将蛋白标准品(1mg/mL)稀释至 0 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.8 mg/mL, 1.0 mg/mL。

(b)根据 Nanodrop2000 粗测蛋白样品的浓度,使用 Binding buffer 稀释至 0~1mg/mL。

(c)每个待测样品设置三组平行,取 20µL 标准品和 20µL 稀释后的待测样品加至含 有 200µL Bradford 工作液的 96 孔板中,混合均匀。

(d)使用酶标仪在 595nm 处检测吸光值,根据标准样品吸光值计算标准曲线计算,进 而计算出待测蛋白浓度。

4.3.3 非天然底物反应检测

(1) 酶促反应:反应体系如表 4-3 所示,底物共 12 种: 2-己酮, 2-氧化戊二酸二钠, Arabinose, Galactose, Mannose,环己酮,环己烯(2-Cyclohexen),环戊酮,肌醇,葡萄酸内 酯,葡萄糖,井冈霉烯酮。

れて5 気差れや時時に次座件が							
	Substrate	L-Glutamine	PLP	Enzymo			
V(µl)	100mM	200mM	8mM	Liizyine	总体积		
	稀释 10 倍使用	稀释5倍使用	稀释 20 倍使用				
酶空白对照	5	10	2.5	0			
底物空白对照	0	10	2.5				
酶灭活对照 (酶预先加热灭活)	5	10	2.5	终浓度 1mg/ml	50µl		
实验组	5	10	2.5				

表 4-3 氨基转移酶酶促反应体系

(2) 37℃水浴加热,反应 2h。反应完成后,加入 50µL 甲醇终止反应。在 PCR 管离心 仪上离心 3~5min,将蛋白质沉淀。

(3)用 1ml 针管小心将上清液吸取出来,注意不要吸到沉淀。将液体经过 0.22µl 水系 滤膜过滤后加入内插管中,轻轻弹动除去气泡。

(4) 高效液相色谱(HPLC)检测:

(a) 色谱柱: Agilent XDB-C18 反向色谱柱(5µm, 4.6×150mm)。

(b) 按照 78% 超纯水 I, 22% 乙腈比例进行柱平衡, 20~30min 后待压力稳定后跑样。 样品洗脱程序: 0~8min, 78% 超纯水 I, 22% 乙腈; 8~12min, 100% 乙腈; 12~17min, 78% 超 I 水, 22% 乙腈。

(c)检测器:荧光检测器,激发波长 240nm,发射波长 450nm。紫外检测器,340nm 检测。

(d) 柱温: 30℃。

(e)样品放置:样品栏第一格放置 OPA 衍生化试剂,第二格放置超纯水 I,第三格放置甲醇,其余各格放置样品。

(f) 进样程序:

a.进样针以 50µL/min 的速度吸取 10µL 样品;

b.抽取甲醇清洗针1次;

c.进样针以 50µL/min 速度抽取 10µL OPA 衍生剂;

d.抽取超纯水 I 洗针 1 次;

e 抽取 20µl 样品与 OPA 衍生剂在空气中混合 8 次;

f.室温等待 0.5min;

g.进样。



(g) 柱清洗: 78% 超纯水 I, 22% 乙腈, 0.5ml/min 冲洗柱子 1h 以上; 100% 乙腈继续冲洗 1h 以上。结束后乙腈液封保存柱子。

## 4.4 结果与讨论

#### 4.4.1 功能糖胺非天然底物的推测

井冈霉烯胺设计途径的研究证实, WecE 和 BtrR 等糖氨基转移酶家族成员可以直接识 别无 NDP 或磷酸化修饰的吡喃糖环,生成相应的氨基产物;为依据合成生物学理念,采用 氨基转移酶直接识别吡喃糖羰基前体合成功能糖胺奠定了重要的理论基础。本章从天然糖胺 类化合物的结构出发,利用"逆向分解,设计合成"的方案,利用 SciFinder,通过结构式进行搜索,可找到图 4-2 所示的功能糖胺潜在的非天然底物。由于实验时间限制,以及这些非 天然底物需要订购合成,花费周期较长,本实验采用了 4.3.3 中提到的 12 种非天然底物进行 氨基转移酶非天然底物催化活性的探究。



图 4-2 功能糖胺与设计底物

**A:** 天然功能糖胺类化合物; B: 依据"逆向分解,设计合成"原则的推测底物 4.4.2 高效液相色谱检测结果

采用氨基转移酶 WecE 和 BtrR 对 4.3.3 中提到的 12 种非天然底物进行了体外催化实验。反应液采用氨基偶联试剂 OPA 衍生化后经 HPLC 分析,结果如图 4-3。





图 4-3 候选酶催化非天然底物 OPA 衍生化 HPLC 分析

通过高效液相色谱(HPLC)进行非天然底物催化筛选时,实际产物的出峰时间未知,因此 在实验过程中应尽量延长样品检测时间。由于加入甲醇停止反应后,上清液中仍可能有少量 的小分子肽存在,这些杂质本身可能具有吸收峰,因此在紫外检测条带上会出现较多的干扰 峰。而荧光信号较为稳定,可作为是否有产物生成的判断依据。从图 4-3 中可以看到,以井 冈霉烯酮作为底物时,WecE 和 BtrR 都能够将其转化为氨基产物,与前期实验结果相符;利 用 WecE 和 BtrR 对其他非天然底物进行转化,结果表明阿拉伯糖在 BtrR 催化作用下产生了 能够被 OPA 衍生化的氨基产物峰。这表明氨基转移酶存在潜在的非天然底物识别性,但是 由于 HPLC 检测并不能将产物结构展示出来,后续实验中可继续进行重复验证试验,以及高 效液相-质谱联用、NMR 等方法进一步鉴定产物的具体结构。



## 第五章 结论与展望

本研究在前期获得的识别非天然底物井冈霉烯酮生成不同立体构型氨基产物的氨基转移酶及其突变体的基础上,采用 L-谷氨酸偶联法对前期获得的优秀突变体的酶动力学参数进行了测定,评价了突变位点对活力提升的贡献,确定了 Loop9 在 WecE 催化过程中的关键作用;采用计算生物学手段对野生型 WecE 及最优突变体 VarB 与非天然底物中间体 PMP-井冈霉烯酮的相互作用进行了分子动力学模拟,解析了 VarB 活力提高的分子机制;比较了WecE、BtrR 和 ArnB 三种不同立体选择性氨基转移酶活性中心结构与关键氨基酸组成,提出了由西夫碱中间体顺反异构引起糖环翻转、产生不同氨基构型产物的立体选择性机制;采用功能糖胺结构"逆向分解,设计合成"的原则,推测了功能糖胺潜在的羰基前体,探究了糖氨基转移酶催化非天然底物的能力,发现糖氨基转移酶 BtrR 可以识别阿拉伯糖,产生能够被 OPA 衍生化的氨基产物。

氨基糖类化合物和氨基假糖类化合物,是糖代谢相关疾病药物开发前体的资源库。其中 假氨基糖类化合物具有葡萄糖苷酶抑制活性,在糖尿病、癌症、艾滋病的治疗,以及农业生 产中可发挥重要作用。而氨基糖类化合物结构更加丰富,其衍生物大多在生物活动中起到关 键性作用,在化工合成,遗传发育,代谢调控中都具有重要作用。目前主要的合成方法化学 合成法和微生物半合成法都存在着步骤较多,操作复杂,收率较低,纯度较低,成本较高等 问题。本论文围绕井冈霉烯胺设计途径中氨基转移酶底物识别机制,探讨了影响异源氨基转 移酶对非天然底物识别、活力提升、立体选择性的关键氨基酸残基组成及底物结合方式;突 破了氨基转移酶底物识别的传统认知,证实该氨基转移酶家族成员可以直接识别无 NDP 或 磷酸化修饰的吡喃糖环;提出了由西夫碱中间体顺反异构引起糖环翻转,产生不同氨基构型 产物的立体选择性机制;为依据合成生物学理念,采用氨基转移酶直接识别吡喃糖羰基前体 合成功能糖胺奠定了重要的理论基础。



# 参考文献

[1] Piepersberg W, Distler J. Aminoglycosides and sugar components in other secondary metabolites[J]. Biotechnology Set, Second Edition, 1997:397-488

[2] 雷娜. N,N-二乙酰基保护的氨基葡萄糖供体的合成及其糖苷化反应研究[D].山东大学,2019.

[3] Skarbek K, Milewska MJ. Biosynthetic and synthetic access to amino sugars[J]. Carbohydr Res. 2016;434:44-71.

[4] Zhou TC, Zhong JJ. Production of validamycin A from hemicellulose hydrolysate by Streptomyces hygroscopicus 5008[J]. Bioresour Technol. 2015;175:160-166.

[5] Ríos JL, Francini F, Schinella GR. Natural Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus[J]. Planta Med. 2015;81(12-13):975-994.

[6] Kawamura N, Sawa R, Takahashi Y, Sawa T, Naganawa H, Takeuchi T. Pyralomicins, novel antibiotics from Microtetraspora spiralis. III. Biosynthesis of pyralomicin 1a[J]. J Antibiot (Tokyo). 1996;49(7):657-660.

[7] Suzuki Y. Chaperone therapy update: Fabry disease, GM1-gangliosidosis and Gaucher disease[J]. Brain Dev. 2013;35(6):515-523.

[8] Agarwal J. Progress in aminosugar derived asymmetric organocatalysis[J]. Org Biomol Chem. 2016;14(46):10747-10762.

[9] Cogoli A, Semenza G. A probable oxocarbonium ion in the reaction mechanism of small intestinal sucrase and isomaltase[J]. Journal of Biological Chemistry, 1975, 250(19):7802.

[10] 聂莹,陈俊帆,苏东海,韭泽悟,李志姣,程永强.α-葡萄糖苷酶抑制剂的研究进展及食品源抑制剂的开发前景[J].农产品加工(学刊),2012(03):18-23.

[11] Brunton S. Pathophysiology of Type 2 Diabetes: The Evolution of Our Understanding[J]. J Fam Pract. 2016;65(4 Suppl)

[12] Chapel C, Garcia C, Roingeard P, et al. Antiviral effect of alpha-glucosidase inhibitors on viral morphogenesis and binding properties of hepatitis C virus-like particles[J]. J Gen Virol. 2006;87(Pt 4):861-871.

[13] 王红英, 姜国平. 井冈霉烯胺的合成路线研究[J]. 浙江化工, 2015, 46(3):30-35.

[14] Chen X, Fan Y, Zheng Y, et al. Properties and Production of Valienamine and Its Related Analogues[J]. Cheminform, 2003, 34(32):1955-77.

[15] Seiichiro Ogawa, Yasunobu Miyamoto, Akihiro Nakajima. Cleavage of the Imino Bonds of Validoxylamine A Derivatives with N-Bromosuccinimide[J]. The Chemical Society of Japan, 1989, 18(5).

[16] Ogawa S, Nakajima A, Miyamoto Y. Cleavage of Validoxylamine A Derivatives with NBromosuccinimide:Preparation of Blocked Synthons Useful for the Construction of Carbaoligosaccharides Composed of Imino Linkages[J]. J Chem Soc, PerkinTrans., 1991,3287.

[17] 丁伟. 井冈霉烯胺和井冈霉醇胺的全合成研究以及二苯乙烯类化合物的合成与应用[D]. 华东理工大学,2016.

[18] 全娜. 从莽草酸出发合成井冈霉醇胺和一些手性环氧中间体以及氯化铜促进的肟与腙



再生成醛酮的方法研究[D].华东理工大学,2013.

[19] Mitsuo Hayashida,Nobuo Sakairi,Hiroyoshi Kuzuhara. Novel Synthesis of Penta-N,O-Acetylvaliolamine[J]. Journal of Carbohydrate Chemistry,1988,7(1).

[20] Jens Nielsen, Jay D. Keasling. Engineering Cellular Metabolism[J]. Cell, 2016, 164(6).

[21] Bai L, Li L, Xu H, et al. Functional analysis of the validamycin biosynthetic gene cluster and engineered production of validoxylamine A[J]. Chem Biol. 2006;13(4):387-397.

[22] Cui L, Zhu Y, Guan X, Deng Z, Bai L, Feng Y. De Novo Biosynthesis of  $\beta$ -Valienamine in Engineered Streptomyces hygroscopicus 5008[J]. ACS Synth Biol. 2016;5(1):15-20.

[23] Cui L, Guan XQ, Liu ZM, Fan LY, Li Q, Feng Y. A new pre-column derivatization for valienamine and beta-valienamine using o-phthalaldehyde to determine the epimeric purity by HPLC and application of this method to monitor enzymatic catalyzed synthesis of beta-valienamine[J]. J Asian Nat Prod Res. 2017;19(4):347-357.

[24] Cui L, Wei X, Wang X, Bai L, Lin S, Feng Y. A Validamycin Shunt Pathway for Valienamine Synthesis in Engineered Streptomyces hygroscopicus 5008[J]. ACS Synth Biol. 2020;9(2):294-303.
[25] 刘辉. 7-磷酸景天庚酮糖供应底盘细胞的构建与初步应用[D].上海交通大学,2019.

[26] Bum-Yeol Hwang,Byung-Kwan Cho,Hyungdon Yun,Kinera Koteshwar,Byung-Gee Kim. Revisit of aminotransferase in the genomic era and its application to biocatalysis[J]. Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic,2005,37(1).

[27] Sebastián L. Márquez, Joaquín Atalah, Jenny M. Blamey. Characterization of a novel thermostable (S)-amine-transaminase from an Antarctic moderately-thermophilic bacterium Albidovulum sp. SLM16[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2019, 131.

[28] A. Nedal, S. B. Zotchev. Biosynthesis of deoxyaminosugars in antibiotic-producing bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2004,64(1).

[29] Christopher J. Thibodeaux, Charles E. Melançon, Hung-wen Liu. Unusual sugar biosynthesis and natural product glycodiversification[J]. Nature: International weekly journal of science, 2007, 446 (7139).

[30] Anthony J. Romo, Hung-wen Liu. Mechanisms and structures of vitamin B 6 -dependent enzymes involved in deoxy sugar biosynthesis[J]. BBA - Proteins and Proteomics, 2011, 1814(11).

[31] Johan N Jansonius. Structure, evolution and action of vitamin B 6 -dependent enzymes[J]. Current Opinion in Structural Biology,1998,8(6).

[32] Bum-Yeol Hwang,Hwa-Jin Lee,Yung-Hun Yang,Hwang-Soo Joo,Byung-Gee Kim. Characterization and Investigation of Substrate Specificity of the Sugar Aminotransferase WecE from E. coli K12[J]. Chemistry & amp; Biology,2004,11(7).

[33] Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline[J]. Nucleic Acids Res. 2016;44(14):6614-6624.

[34] 汪世华. 蛋白质工程[M]. 北京:科学出版社,2016:24-25.

[35] 张红缨,孔祥铎,张今.蛋白质工程的新策略——酶的体外定向进化[J].科学通报,1999(11):1121-1127.

[36] 贺霖伟,刘璋敏,冯雁,崔莉.谷氨酸依赖型氨基转移酶的高通量筛选方法及其应用[J].中国 生物工程杂志,2017,37(08):59-65.

[37] Michaelis L, Menten ML. Die Kinetik der Invertinwirkung[J]. Biochemische Zeitschrift. 1913;49:333–369.

[38] Wang F, Singh S, Xu W, et al. Structural Basis for the Stereochemical Control of Amine Installation in Nucleotide Sugar Aminotransferases[J]. ACS Chem Biol. 2015;10(9):2048-2056.





[39] Trevor R. Zachman-Brockmeyer, James B. Thoden, Hazel M. Holden. The structure of RbmB from Streptomyces ribosidificus, an aminotransferase involved in the biosynthesis of ribostamycin[J]. Protein Science, 2017, 26(9).

[40] Brian W. Noland, Janet M. Structural Studies of Salmonella typhimurium ArnB (PmrH) Aminotransferase[J]. Structure, 2002, 10(11).

[41] CUI Li,Karin Yanagi,SHI Ting,LIU Zhang-Min,BAI Lin-Quan,FENG Yan. A quantitative analytical method for valienone and its application in the evaluation of valienone production by a breakthrough microbial process[J].Chinese Journal of Natural Medicines,2017,15(10):794-800.



## 致谢

首先非常感谢我的指导老师崔莉老师,从毕业设计的选题到论文完成,都是在崔老师 的悉心指导下完成的。在毕业设计进行的过程中,我遇到了很多的问题,而崔老师都能以 非常专业并且严谨的科学研究态度,为我提供指导和帮助。无论是在实验设计还是在数据 分析上,崔老师都能用其专业的知识和丰富的工作经验,给我最合适的改进意见。而在生 活中,我也深深感受到了崔老师的亲和力。在我心情低落或是为之后的学习道路感到迷茫 时,崔老能够耐心地给予我安慰和鼓励,也能及时给我一些有用的意见和建议。在完成此 次毕业设计的过程中,我从崔老师身上受益良多,是我在科研道路上不断学习的榜样。

感谢冯雁教授在实验过程中给予的帮助和指导。感谢陈海峰教授在生物信息学中提供 的理论和技术指导。在课题进行中,由于我之前对生物信息学领域接触不多,陈海峰教授 和刘灏师兄给我提供了很多技术上的支持和帮助,也非常耐心地向我展示了该部分的理论 依据,并且也为我自主学习该部分内容提供了指导和意见。这对本课题的成功完成提供了 很大帮助。

也感谢实验室的其他成员们: 陈柳青、邓茜、武志赟、刘璋敏、刘璐、刘辉、崇曰 盛、何远志、樊文杰、厉刚刚、张展,感谢你们在实验中和生活上给我的帮助和鼓励。在 进行实验的生活中总是会遇到各种困难,或是长时间的实验而疲倦。是你们的支持、陪伴 与关心让我能够继续以积极的心态顺利完成课题。尤其感谢刘辉师兄、厉刚刚师兄。在初 期进行实验的过程中,你们教会了我许多的实验技巧,给了我很多实验设计和操作的启 发。遇到实验结果不理想的时候,你们给了我很多的指导,为我答疑解难。还要非常感谢 张展师兄,给了我非常大的帮助。虽然我们认识的时间不长,但从毕业设计开始之后,您 一直都能及时地给我帮助和指导,指出我存在的问题并帮助我去改进。在我接触不熟悉的 实验操作时,手把手地教会我。由衷感谢您的热心帮助和指导,正是在您的支持下,我才 能顺利完成课题。

其次还要感谢我身边的同学们,在我需要帮助的时候及时出现。在我遇到难题的时候,与你们讨论总能给我莫大的勇气继续前行。当我向你们求助的时候,你们毫不吝啬地伸出援助之手,无论是口头上的指导,还是给我发来各种学习资料,都给了我非常大的帮助。

最后要感谢我的父母和亲人,你们一直无条件地支持、鼓励着我。尤其在大学最后的 这段时间里经历了很多选择和磨难,是你们无微不至的关心和爱意,让我能够坚持下去, 一直不断前行。



# STUDY ON THE SUBSTRATE RECOGNITION MECHANISM OF AMINOTRANSFERASE IN THE DESIGN PATHWAY OF VALIENAMINE

Amino sugars and pseudo-aminosugars are two kinds of substances with a similar structure. Among them, pseudo-aminosugars have glucosidase inhibitory activity and play an essential role in the treatment of diabetes, cancer, AIDS and agricultural production. However, aminosugars are more abundant in structure. Most of their derivatives play a crucial role in biological activities. They play an essential role in chemical synthesis, genetic development and metabolic regulation. However, there are many problems in the main synthesis methods, such as chemical synthesis and microbial semi syntheses, such as many steps, complicated operation, low yield, low purity and high cost.

In previous studies, the cyclase, isomerase and dehydratase existing in the process of natural metabolism of validamycin by Streptomyces hygroscopicus can be used to obtain the precursor substance of valienamine, valiolamine. After the introduction of an exogenous glycosyltransferase, validamycin can be successfully transformed into validamycin. In this step, through the similarity of substrates, the possible enzyme families are collected in the database, and the glycosyltransferases WecE and BtrR which can specifically select the chiral conformations of the catalytic products are selected. Due to the low catalytic activity of WecE. Based on wild-type enzyme, protein engineering was used to carry out semi-rational design, to obtain the mutant with an iterative mutation with increased activity. The kinetic parameters of these mutants need to be further verified so that more accurate analysis results can be obtained in the process of artificial metabolism of pseudo-aminosugars. At the same time, it also provides primary data for enzyme activity improvement when valienone is used as the substrate for the catalytic reaction. In this study, the enzyme transamination and glutamate dehydrogenase catalysis were coupled by high-throughput method, so that a small number of systems could be used to monitor the initial data of enzyme activity in order to obtain enzyme kinetic parameters.

In the specific experiment process, when using Origin software to fit the Michaelis equation curve, the fitting effect is closely related to the measurement results. At the initial stage, when the concentration of the substrate is low, it is easy to reach the inflexion point of the Michaelis equation curve or even the platform stage. After increasing the gradient of low concentration substrate, the fitting effect was improved obviously. However, after a long period of measurement data, the platform period data has an unexpected significant fluctuation, which is very unfavourable for the fitting effect. Considering that the whole experiment needs the continuous operation of the enzyme labelling instrument at 37°C, this condition may cause a great pressure on the instrument itself, so that the signal fluctuation phenomenon appears in the subsequent detection. The follow-up supplementary experiment can be aimed at this problem, design a control experiment, and measure the activity of each aminotransferase at 25°C.

In this paper, the mechanism of the enhancement of the catalytic activity and stereoselectivity



of aminotransferase was also explored to some extent. Based on the crystal structure of glycosyltransferase which can be found in PDB database, the molecular docking simulation was carried out between the glycosyltransferase and PMP-valienone, a complex of substrate and ligand molecules. Then the difference of active amino acids between VarB and WecE was analyzed. Through amino acid sequence analysis and structure comparison, we found that the introduction of the mutation site weakened the interaction between Loop9 and the substrate intermediate, and reduced the distance from the active lysine. This mechanism can play a guiding role in the promotion of the catalytic ability of ketose substrate recognition.

Besides, we also compared the catalytic activity of three different stereoselective aminotransferases. In the static comparison, it can be seen that the difference between WecE and BtrR is relatively small, which may be due to the different binding mode of crucial amino acid residues and the different binding positions of ligand molecules, resulting in the different orientation of substrate molecules in the catalytic process, and then different chiral products are produced. Furthermore, it can be seen from the comparison between WecE and BtrR that the active lysine in the enzyme molecules has a significant similarity in spatial position and direction of action. It is suggested that the stereoselectivity of our products may be due to the E and Z configurations of the substrate intermediates. The analysis of its spatial structure can further understand the process, which is conducive to the subsequent design of enzyme molecular catalytic activity, as well as the selection and modification design of enzyme molecules when the non-natural substrate catalyzes to obtain chiral products.

Based on the docking of the molecules, the dynamic and static analysis of the enzyme-substrate complex can be carried out in future research. The sequence aligns function and aligns the structure-function of discovery studio can be used to compare the amino acid sequence of the protein and the spatial structure combined with the substrate. Furthermore, the software can be used for molecular dynamics simulation to analyze the energy change of each amino acid residue and the overall structure change of enzyme-substrate complex in the process of transamination product formation under the catalysis of enzyme molecules after the combination of substrate and enzyme, to know more clearly which conformation the substrate has in the catalytic process as well as the energy change. It is more clear to compare the differences between the two different stereoselective aminotransferases in the catalytic process: for example, the difference of amino acid residues involved in the reaction, the difference of the molecular stability of the substrate, the difference of the vital electron transfer mode, the difference of the spatial structure site, etc. All of these can help us to understand better the stereoselective mechanism of aminotransferase and the binding, catalytic mechanism of the substrate.

The ability of glycosyltransferase to catalyze unnatural substrate was also explored. After analyzing the structures of several aminotransferases and finding out the possible carbonyl substrates, we can find similar potential substrates through the core six-membered ring structure. Finally, 11 unnatural substrates and valienone were selected for the reaction. However, because some of these substrates cross polarity and even inhibit enzyme activity, the overall efficiency of the substrate may not be high. The sensitive OPA on-line derivatization method was also used in the detection. From the results, arabinose has the potential to be catalyzed by BTRR aminotransferase. However, whether the product exists and how the product structure needs to be further verified by HPLC-MS and other means.

In the actual operation process, the number of samples is relatively large, including the blank



control group needs to carry out more than 200 sample determinations, which is a large workload for the chromatographic column. At the same time, the number of parallel groups can be further increased to enhance the reliability of the data. Also, in the following experiments, the specific structure of the substrate needs to be considered. Therefore, the ideal condition is to use the inversely derived carbonyl sugar substrate for the reaction, which is most likely to obtain a successful catalytic result.

In this paper, we studied the physical and chemical properties of the critical aminotransferases from the synthetic pathway of valienamine. In the following experimental research, it can play a guiding role in the critical steps of transamination. In the further exploration, we can further construct the catalytic reaction of cyclase, isomerase and transaminase coupling together, to establish the three-dimensional catalytic pathway of valienamine or valiolamine, which lays the foundation for the exploration of the biosynthesis pathway of pseudo-aminosugars. At the same time, we can also carry out the biological standardization of aminotransferase synthesis for more unnatural ketose substrates, and carry out directional selection and transformation for its catalytic activity and product stereoselectivity.