

米曲霉木糖醇脱氢酶的分子建模与对接

陈宏文¹, 苟元波¹, 张卡¹, 方柏山^{2*}

¹ 华侨大学化工学院生物工程与技术系, 厦门 361021

² 厦门大学化学化工学院, 厦门 361005

摘要: 【目的】研究米曲霉木糖醇脱氢酶基因的结构与功能。【方法】克隆测序来源于米曲霉的木糖醇脱氢酶(XDH)基因,利用 Swiss-MODEL 和 Modeller 对 XDH 进行三级结构建模,通过 PROCHECK 和 Prosa2003 对得到的 4 个目标模型进行评价,从中得到一个最佳模型。在同源建模的基础上,通过分子对接软件 Molsoft ICM-Pro,对辅因子进行对接,预测了 XDH 与 NAD⁺、Zn²⁺ 作用的相关残基。寻找底物木糖醇与 XDH 结合的可能活性口袋,用 Molsoft 模拟 XDH 与木糖醇的对接,预测了酶与底物作用的关键氨基酸残基。【结果】结构分析显示,米曲霉 XDH 含有醇脱氢酶家族锌指纹结构和典型醇脱氢酶 Rossmann 折叠的辅酶结合域,属于 Medium-chain 脱氢酶(MDR)家族。通过对接研究,预测了 XDH 与 NAD⁺ 之间形成氢键的氨基酸有 Asp206、Arg211、Ser255、Ser301 和 Arg303,这些氨基酸位于结合域,与 Zn²⁺ 形成氢键的氨基酸有 His72 和 Glu73,位于催化域,与天然底物木糖醇形成氢键的氨基酸有 Ile46、Ile349、Lys350 和 Thr351,位于催化域。【结论】所得信息对 XDH 分子定向改造、拓展米曲霉工业应用范围有重要意义。

关键词: 木糖醇脱氢酶,米曲霉,同源建模,分子对接

中图分类号: 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2011)07-0948-08

木糖醇脱氢酶(XDH, EC1.1.1.9)是真核微生物木糖代谢的关键酶之一,酵母和真菌主要通过氧化还原途径吸收利用木糖。即木糖首先由依赖 NAD(P)H 的木糖还原酶(XR, EC1.1.1.21)还原为木糖醇,然后木糖醇由依赖 NAD⁺ 的木糖醇脱氢酶氧化成木酮糖,后者再被磷酸化成 5-磷酸木酮糖进入戊糖磷酸途径。木糖是可再生木质纤维素中仅次于葡萄糖的第二大糖类,其有效利用已日益成为工业生物技术研究热点。XDH 的相关研究具有重要的应用价值,如在木糖转化燃料酒精方面,研究酿

酒酵母中异源过量表达 XDH^[1-2],通过分子改造改变 XDH 的辅酶依赖性^[3-5]等;在木糖转化木糖醇(源于木糖的最主要化学品)方面,研究通过分子手段抑制 XDH 酶活力提高木糖醇得率^[6]等。目前微生物来源的只有 *Gluconobacter oxydans* 的 XDH 有晶体结构和功能研究^[5],利用模型预测 XDH 结构和功能,所报道的菌种主要有 *Candida tropicalis*^[7]、*Rhizobium etli*^[8]、*Pichia angusta*^[9]等。

米曲霉(*Aspergillus oryzae*)是一种重要工业微生物,应用于食品加工和发酵工业已有几千年历史,具

基金项目:国家自然科学基金(20676048);教育部留学回国人员科研启动基金(2010);福建省自然科学基金(D0810015);福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划(07FJRC03);华侨大学基本科研业务费专项基金(JB-2R1112)

* 通信作者。Tel: +86-592-2185869; E-mail: fbs@xmu.edu.cn

作者简介:陈宏文(1969-),女,浙江德清人,副教授,博士,研究方向生物代谢工程和酶工程。Tel: +86-595-22692447; E-mail: chenhw@hqu.edu.cn

收稿日期:2011-01-25;修回日期:2011-03-29

有极高的食品安全性。米曲霉能分泌大量的胞外木聚糖降解酶^[10]—— β -1,4-D-内切木聚糖酶、 β -1,4-D-木糖苷酶和 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶,而且近年发现其胞内也含有木糖代谢的关键酶——XDH^[11]。2005年破译的米曲霉基因组数据显示,米曲霉的碱基对数在当时已破译基因组的微生物中是最多的,基因数量也比相近的曲霉多出30%左右,具有许多独特的生物特征^[12],这为拓宽米曲霉的工业应用范围提供了可能,即米曲霉不仅可用于酿酒业淀粉糖化,还有可能用于木质纤维素的多元糖醇生产。目前国内外关于米曲霉 XDH 结构和功能的研究鲜有报道,本文在克隆米曲霉 XDH 基因基础上,通过序列比对、XDH 三级结构同源建模、利用分子对接模拟 XDH 与底物木糖醇、辅酶和 Zn^{2+} 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,为后续的米曲霉 XDH 定向改造提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: *Aspergillus oryzae* 2120 和 2012, 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。*E. coli* DH5 α 实验室保存;pUC19 质粒购自大连宝生物有限公司;pUCm-T 多克隆载体购自上海生物工程有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器: *Taq* DNA polymerase、Rnase A、dNTP、*Taq* Plus DNA polymerase、EZ Spin Column DNA Gel Extraction KIT、EZ Column Plasmid Mini-Preps Kit、 T_4 连接酶购自上海生物工程有限公司;所用限制性内切酶、分子质量标准购自大连宝生物有限公司;引物由上海生物工程有限公司合成。PCR 仪 (DNA Engine), BIO-RAD; 电泳仪 (DYY-8C), 北京市六一仪器厂; 凝胶成像系统 (GIS-2008), 上海天能公司。

1.1.3 主要数据库和软件: 国际互联网上的生物信息学数据库;可视化软件 Rasmol、Chimera、VMD 等;对接软件 Molsoft ICM-Pro;分析编辑软件 BioEdit、Modeller9v4、Clustal X、TreeView、Prosa2003 等。

1.2 米曲霉木糖醇脱氢酶基因克隆

基因克隆按分子生物学手册操作,主要包括米曲霉基因组 DNA 提取,PCR 扩增 *xdh*, *xdh* 与 pUCm-

T 载体连接,连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞以及阳性克隆子鉴定。测序由上海英骏 (Invitrogen) 生物技术公司完成,返回的测序结果翻译成蛋白质与不同来源的木糖醇脱氢酶氨基酸进行序列比对。

1.3 同源建模

通过同源建模服务器 SWISS-MODEL 自动返回一个目标模型。选择 Swiss-Model 返回的 SWISS MODEL WORKSPACE 中同源性较高的 3 个模板,在软件 Modeller9v4 环境下手动建模得到另外 3 个目标模型。

1.4 模型评价

用在线评价服务器 PROCHECK 对 2 种方法所建模型进行分析,评价模型质量;同时用 Prosa2003 对所建模型进行残基能量分析,确定质量最好的模型进行后续对接研究。通过 VAST 搜索 XDH 结构域,再通过 CDD 搜索可能含有的家族结构域。

1.5 模型与辅助因子的对接

最终模型所用的模板 1pl8 (PDB 登陆号) 是一种来源于人的琥珀酸脱氢酶与辅酶 NAD^+ 以及配体 Zn^{2+} 相结合的复合物。用 LPC 程序分析模板 1pl8 中与 NAD^+ 、 Zn^{2+} 发生作用的残基,将分析得到的残基通过序列比对的方式查找在目标模型 XDH 中相对应的残基的相似性。

通过软件 Molsoft ICM-Pro (Version 3.5a) 对同源建模得到的最佳模型与模板 1pl8 进行重叠,近似确定辅助因子的大概位置。去掉模板链,留下模板链的辅因子。若重叠效果较好,目标模型中辅助因子的大概位置也就在模板链辅因子位置附近。再以当前辅因子周围的氨基酸为可能结合位点,进行分子对接,找到目标模型与辅因子的结合位点。

1.6 模型与底物的对接

底物分子木糖醇 (Xylitol) 化学结构文件可以从 KEGG 获取。辅酶对接好后,用 Molsoft 中的 icmPocketFinder 程序搜索活性口袋;模拟 XDH 与木糖醇对接,分析对接结果。

2 结果和讨论

2.1 米曲霉木糖醇脱氢酶基因同源比对分析

A. oryzae 2120 和 2012 XDH 基因克隆后测序结果如图 1 所示,NCBI 登录号为 GQ222266 和

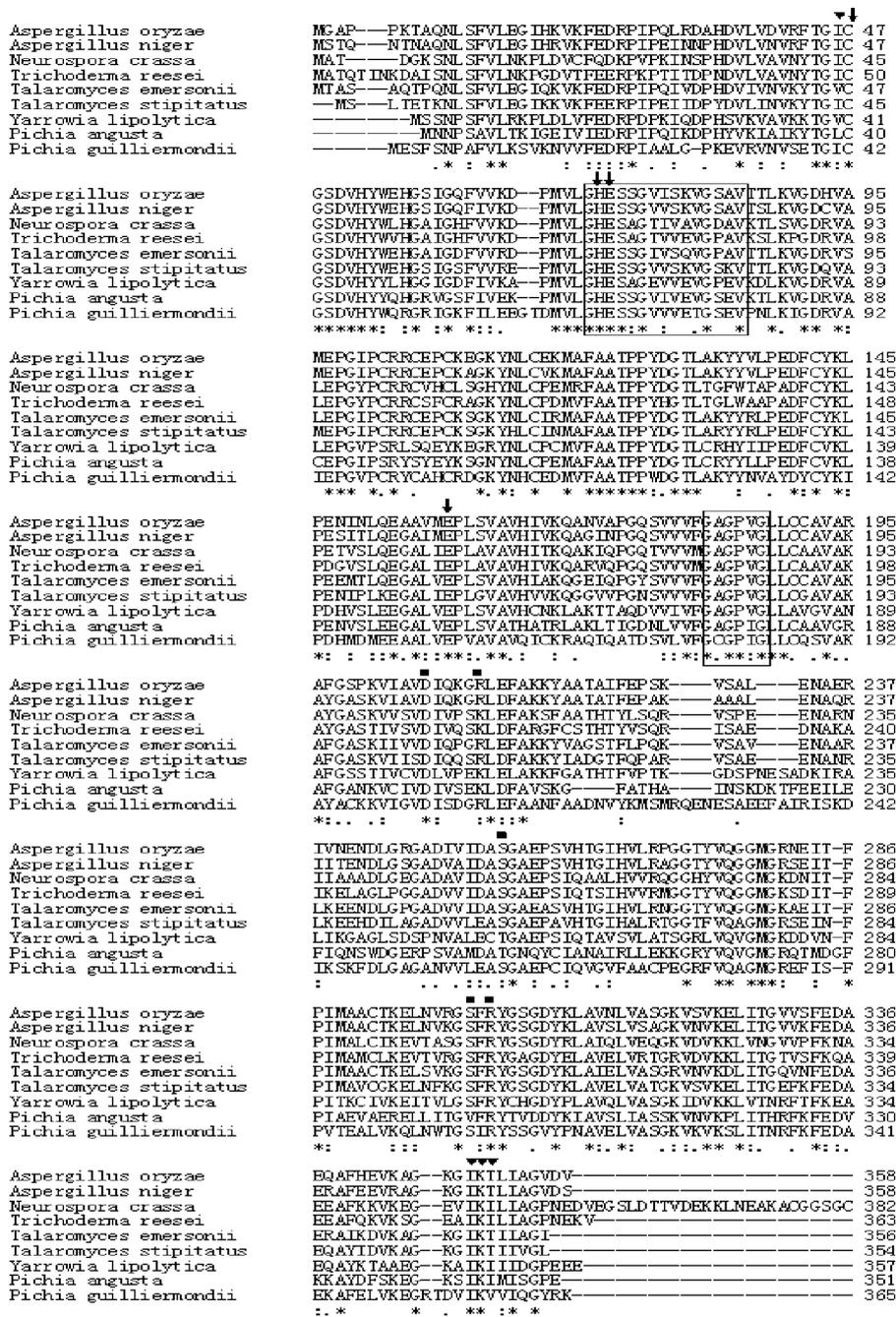


图 1 不同来源 XDH 多序列比对

Fig. 1 Multiple sequence alignment of XDH from different origins. The residues involved in the coenzyme , catalytic zinc and xylitol binding are indicated by squares (■) , arrows (↓) and triangles (▲). Rectangular pane represents Zinc-containing alcohol dehydrogenases signature.

GQ222265 其碱基序列与来源 *A. oryzae* KBN616^[11] 和 *A. oryzae* RIB40^[12] 的 XDH 碱基序列高度同源, 表达的氨基酸序列完全相同。将 XDH 氨基酸序列进行 BLAST 比对可知, 米曲霉 XDH 与其它 XDH 有较高的同一性 (76% - 85% Sequence Identity, SEQ ID)。与不同来源的 XDH 氨基酸序列进行 Clustal

W 比对 (图 1) 发现, 米曲霉 XDH 含有 PROSITE 报道的含锌醇脱氢酶家族锌指纹结构([GHE]xx[G]xxxx[G]xx[V]), 同时还含有一个 MDR (Medium-chain dehydrogenase/reductase) 家族具有的富含甘氨酸 Rossmann 折叠辅酶结合区域保守片段 ([GxGxxG])^[13], 见图 1 中方框所示。

2.2 同源建模

SWISS-MODEL 是一种依赖于同源建模的程序, 其可信度高于一些从头预测软件。Modeller 软件是近年来发展的一种建立在满足空间约束条件基础上的同源建模方法。该方法的准确度很高, 若模板蛋白与目标蛋白的同一性大于 40%, Modeller 得到的结构模型在很多方面可与中等分辨率 X-衍射结构精度等同。此外, Modeller 程序本身具有很强的结构优化能力, 一般不必再用其它程序 (如 DISCOVER) 进行优化。我们通过 Swiss-Model 自动返回一个目标模型 XDH1 (模板 1e3ja, SEQ ID 为 46%), 选择 Swiss-Model 返回的同源性较高的其它 3 个模板, 通过 Modeller 手动建模得到另外 3 个目

标模型 XDH2、XDH3 和 XDH4 (模板分别为 1pl6A、1pl7A 和 1pl8A, 模板 SEQ ID 均为 42%)。

2.3 目标模型评价

通过 PROCHECK 对上述 2 种方法所建目标模型进行评价, 结果见表 1。从表 1 可以看出拉氏图的核心区 (core) 有 2 个模型质量超过 90%, 均为 Modeller 手动建模得到的模型, 一般认为核心区质量超过 90%, 二面角 (dihedral)、共价键 (covalent) 和角距 (overall) 的质量高于 -0.5 就认为模型比较可靠。综合比较可以发现用 Modeller 手动建模得到的模型比 Swiss-Model 自动返回的模型质量高, 结合表 1 中的数据选择 XDH4 为最佳模型, 并以此模型进行后面的辅因子、底物对接。

表 1 PROCHECK 评价目标模型

Table 1 Evaluation of objective models by PROCHECK

Models	Ramachandran plot quality / %				Goodness factor		
	core	allowed	general	disallowed	dihedrals	covalent	overall
XDH1	86.3	11.3	2.1	0.3	-0.17	0.18	-0.02
XDH2	89.0	9.0	1.3	0.7	-0.08	-1.11	-0.43
XDH3	91.0	7.3	1.3	0.3	-0.05	-1.09	-0.40
XDH4	91.0	7.0	1.7	0.3	-0.04	-1.09	-0.04

用 Prosa2003 对目标模型 XDH4 进行残基相互作用能量分析。Prosa2003 残基能量分析图中结合能 (combined energy) 低于 0 时, 通常认为模型比较可靠。从分析图中可知 (图略), XDH4 的结合能低于 0, 其余两个能量——表面势能 (surface energy) 和配对能 (pair energy) 也接近低于 0, 认为 XDH4 为比较可靠的模型。

最佳模型 XDH4 的三级结构模型用 UCSF Chimera 可视化软件处理, 得到 XDH4 单体结构如图 2 所示。从图 2 可看出, 由 358 个氨基酸多肽链组成的 XDH4 单体被一个很深的口袋 (pocket) 分成两个区域。蓝色端为 N 端, 红色端为 C 端。位于 N-端的区域 B (1aa - 138aa) 由 7 个 β -折叠 ($\beta 1 - \beta 7$) 和 1 个 α -螺旋 (H1) 组成, 是 β -折叠集中分布区域。位于中间片段的区域 A (170aa - 277aa) 由 4 个 α -螺旋 (H3 - H6) 和 5 个 β -折叠 ($\beta 8 - \beta 12$) 连续交替排列组成, 为 α/β 交替 Rossmann 折叠模式, 该 α 、 β 结构亦与二级结构的预测结果 (即将 XDH 的氨基酸序列提交到 NPS@ 网络服务器 (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>), 利用 PHD 程序进行二级结构预测, 结果略) 基本一致。通过 CDD 搜索可知 XDH4 含 2 个醇脱氢酶家族的结构域。通过 VAST 搜索其结构域

可知, domain 1 (1 - 148aa, 324 - 358aa) 为 XDH4 的催化域; domain 2 (149 - 323aa) 为 XDH4 的结合域, 位于 Rossmann 折叠区域中。XDH4 一级结构含有醇脱氢酶锌指结构, 催化活性受 Zn^{2+} 影响, 三级结构含有脱氢酶 Rossmann 折叠的辅因子结合域 (MDR 家族的典型特点^[13]), 说明 XDH4 应属于 MDR 家族。

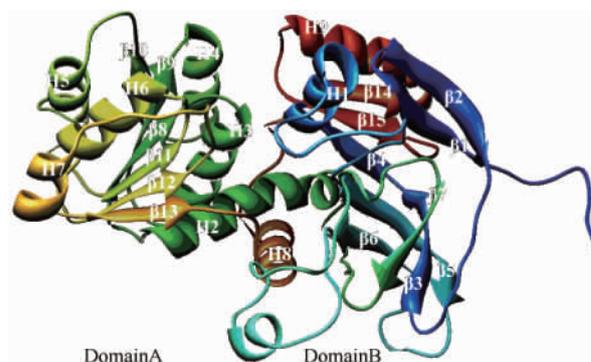


图 2 XDH4 单体三级结构图

Fig. 2 The tertiary structure of *A. oryzae* XDH4 from homology modeling.

2.4 模型与辅因子 NAD^+ 和 Zn^{2+} 的对接

用 LPC 程序分析模板 1pl8 (即最终模型 XDH4

所用模板)与 NAD^+ 、 Zn^{2+} 发生作用的残基,将分析得到的残基与 XDH4 序列做 Clustal X 比对,结果见表 2。由表 2 可知,模板 1p18 结合 NAD^+ 区域中的

28 个残基有 17 个残基与 XDH4 模型相同,同一性达 60.7%,而与 Zn^{2+} 发生作用的 4 个残基与 XDH4 模型完全相同,同一性为 100%。

表 2 NAD^+ 和 Zn^{2+} 作用区域比对

Table 2 Alignment of NAD^+ and Zn^{2+} binding sites

NAD ⁺ binding sites		Zn ²⁺ binding sites			
1p18	XDH4	1p18	XDH4	1p18	XDH4
CYS:44	CYS:47	ILE:223	PRO:226	CYS:44	CYS:47
GLY:45	GLY:48	CYS:249	ALA:254	HIS:69	HIS:72
GLU:155	GLU:158	THR:250	SER:255	GLU:70	GLU:73
VAL:159	VAL:162	ALA:252	ALA:257	GLU:155	GLU:158
GLY:179	GLY:182	ALA:254	PRO:259	PRO:156	PRO:159
GLY:181	GLY:184	SER:255	SER:260		
PRO:182	PRO:185	VAL:272	GLY:277		
ILE:183	VAL:186	GLY:273	GLY:278		
GLY:184	GLY:187	LEU:274	MET:278		
THR:202	VAL:205	VAL:296	SER:301		
ASP:203	ASP:206	PHE:297	PHE:302		
LEU:204	ILE:207	ARG:298	ARG:303		
SER:205	GLN:208	TYR:299	TYR:304		
ARG:208	ARG:211	PHE:337	PHE:342		

Note: Bold type represents similar amino acid on the corresponding site.

分子对接计算是把配体分子放在受体活性位点的位置,然后按照几何互补、能量互补以及化学环境互补的原则实时评价配体与受体相互作用的好坏,并找到 2 个分子之间最佳的结合模式。Molsoft ICM-Pro 是一款采用 ICM 方法实现分子对接采样的软件。ICM 是一种基于 MonteCarlo 结合局部优化技术的全柔性分子对接方法,它通过计算配基与受体之间的静电、立体、氢键作用能以及二者因单键旋转引起的构象自由能变化来评价对接结果。

用软件 Molsoft ICM-Pro (version 3.5a) 将目标模型 XDH4 与模板 1p18 A 链进行重叠,如图 3 所示。从结构上看两个酶单体的三维结构非常相似,而且重叠得非常好,我们可以确定目标模型的辅助因子位置就在重叠后模板辅助因子的位置附近,去掉模板链,留下模板链的辅助因子,再以当前辅助因子周围的氨基酸为可能结合位点,通过 Molsoft 进行 NAD^+ 和 Zn^{2+} 对接,定位出辅因子的结合位点,如图 4 所示。由图 4-A 可以看到 NAD^+ 和 Zn^{2+} 位于酶空间结构的缝隙里;由图 4-B 可以看出 NAD^+ 分别与 XDH 的 5 个氨基酸残基 Asp206、Arg211、Ser255、Ser301 和 Arg303 通过氢键发生作用,结合表 2 可知除 Ser255 和 Ser301 外,其他 3 个氨基酸均与模板 1p18 NAD^+ 作用区域的氨基酸相同。图 1 中显示,



图 3 目标模型 XDH4 与模板 1p18 A 链重叠图

Fig. 3 The tertiary structure superposition of model XDH4 and template 1p18.

Asp206 和 Arg303 完全保守,其他 3 个氨基酸也有较高的保守性,其中 Arg211 与 NAD^+ 中腺嘌呤核糖羟基形成氢键,可能是影响 XDH 辅酶 NAD^+ 专一性的关键氨基酸^[4-5]。与 NAD^+ 结合的 5 个氨基酸全部位于 XDH 结合域中(149-323aa);由图 4-C 可以看出 Zn^{2+} 被 XDH 的 4 个氨基酸残基 Cys47, His72, Glu73 和 Glu158 包围,结合表 2 可知这 4 个氨基酸与模板 1p18 Zn^{2+} 作用区域的氨基酸完全一致,图 1 中也显示这 4 个氨基酸完全保守。其中 His72 和 Glu73 通过氢键与 Zn^{2+} 连接,位于催化域中(1-148aa, 324-358aa),且这两个氨基酸也是醇脱氢酶家族锌指结构保守序列中的氨基酸(即图 1 中的 H

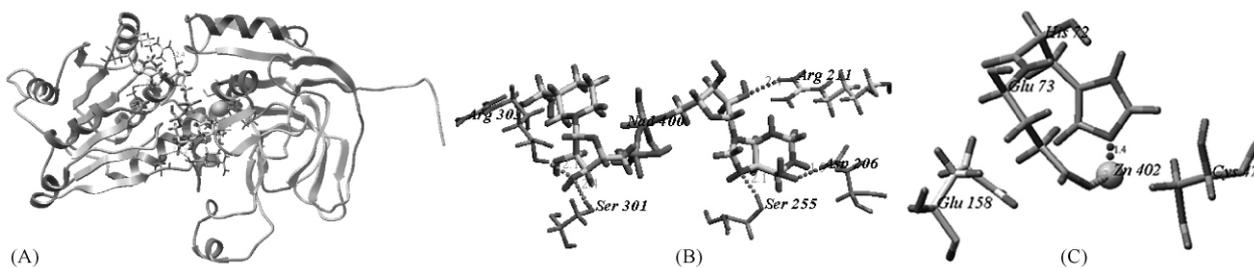


图4 XDH4与辅酶对接示意图

Fig.4 The docking structure of XDH4. A: The whole docking structure of XDH4; B: The NAD^+ binding residues; C: The catalytic Zn^{2+} binding residues.

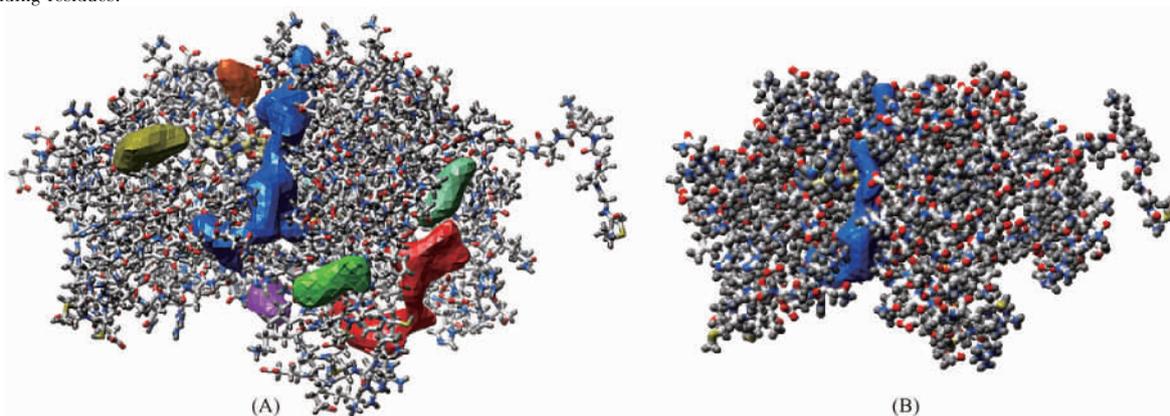


图5 XDH活性口袋示意图

Fig.5 The structure of active pocket of XDH. A: Seven active pockets; B: The active pocket in catalytic site.

和E),这说明高度保守的锌指结构与活性中心 Zn^{2+} 的催化功能密切相关,类似结果也在菌种*Pichia stipitis*^[4]、*Candida tropicalis*^[7]、*Rhizobium etli*^[8]、*Pichia angusta*^[9]中出现。上述结构分析说明了计算机模拟对接结果具有的精确性和合理性。

2.5 XDH与底物木糖醇的对接

从KEGG取得木糖醇的化学结构mol文件(KEGG登陆号为C00379)。用Molsoft软件寻找XDH可能与底物木糖醇结合的活性口袋。搜索到7个活性口袋,如图5-A所示。醇脱氢酶家族发生催化时有一特性,即辅因子和酶结合时,酶构象发生变化,两个结构域之间形成裂缝,好像一个口袋,底物和辅因子就结合在中间形成的这个口袋中。因此选择两个结构域之间的裂口作为活性中心的活性口袋,如图5-B所示。在此口袋中将XDH与底物对接,对接结果如图6所示。由图6-A可知,XDH与底物木糖醇结合的位点与辅酶 NAD^+ 、 Zn^{2+} 比较靠近,由图6-B可知,有4个氨基酸残基Ile46,Ile349,Lys350和Thr351通过氢键与木糖醇发生作用,图1中显示Ile349和Lys350完全保守,Ile46和Thr351

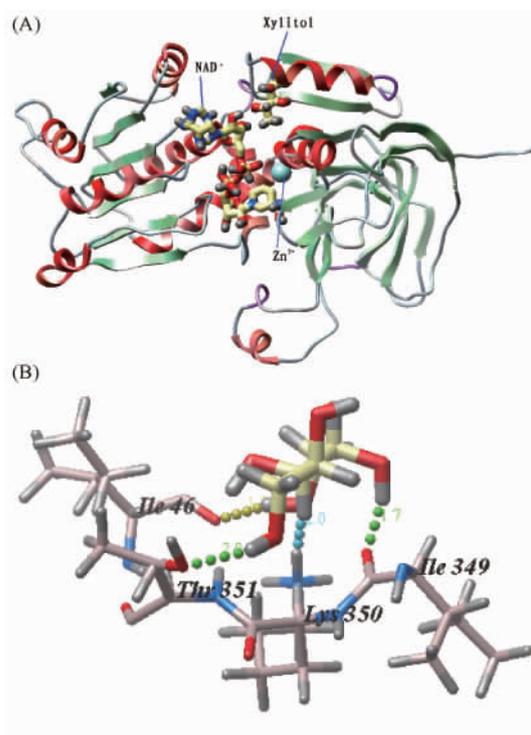


图6 XDH与底物对接示意图

Fig.6 The docking structure of XDH4. A: The docking structure of XDH4 and xylitol; B: The catalytic xylitol binding residues.

也有较高的保守性,且这四个氨基酸全部在催化域中(1-148aa,324-358aa)。

3 结语

本文借助生物信息学手段(序列比对、同源建模和分子对接)在PDB未报道*A. oryzae* XDH晶体结构的情况下,模拟*A. oryzae* XDH与底物木糖醇、辅酶和 Zn^{2+} 的对接,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,为后续定向改造米曲霉XDH、拓展米曲霉工业应用范围奠定了理论基础。

参考文献

- [1] Karhumaa K , Fromanger R , Hahn-Hägerdal B , Gorwa-Grauslund MF. High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology Biotechnology* , 2007 , 73 : 1039-1046.
- [2] Zhang J , Tian S , Zhang Y , Yang X. Construction of a recombinant *S. cerevisiae* expressing a fusion protein and study on the effect of converting xylose and glucose to ethanol. *Applied Biochemistry Biotechnology* , 2008 , 150 : 185-192.
- [3] Krahulec S , Klimacek M , Nidetzky B. Engineering of a matched pair of xylose reductase and xylitol dehydrogenase for xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Journal* , 2009 , 4 (5) : 684-94.
- [4] Watanabe S , Kodaki T , Makino K. Complete reversal of coenzyme specificity of xylitol dehydrogenase and increase of thermostability by the introduction of structural zinc. *The Journal of Biological Chemistry* , 2005 , 280 (11) : 10340-10349.
- [5] Ehrensberger AH , Elling RA , Wilson DK. Structure-guided engineering of xylitol dehydrogenase cosubstrate specificity. *Structure* , 2006 , 14 : 567-575.
- [6] Ko BS , Kim J , Kim JH. Production of xylitol from D-xylose by a xylitol dehydrogenase gene-disrupted mutant of *Candida tropicalis*. *Applied Environment Microbiology* , 2006 , 72 (6) : 4207-4213.
- [7] Lima LHA , Pinheiro CGD , de Moraes LMP , de Freitas SM , Torres FAG. Xylitol dehydrogenase from *Candida tropicalis*: molecular cloning of the gene and structural analysis of the protein. *Applied Microbiology Biotechnology* , 2006 , 73 (3) : 631-639.
- [8] Tiwari MK , Moon HJ , Jeya M , Lee JK. Cloning and characterization of a thermostable xylitol dehydrogenase from *Rhizobium etli* CFN42. *Applied Microbiology Biotechnology* , 2010 , 87 (2) : 571-581.
- [9] Biswas D , Datt M , Ganesan K , Mondal AK. Cloning and characterization of thermotolerant xylitol dehydrogenases from yeast *Pichia angusta*. *Applied Microbiology Biotechnology* , 2010 , 88 (6) : 1311-1320.
- [10] Kimura T , Kitamoto N , Kito Y , Karita^S , Sakka K , Ohmiya K. Molecular cloning of xylanase gene xynG1 from *Aspergillus oryzae* KBN 616 , a shoyu koji mold , and analysis of its expression. *Journal of Fermentation and Bioengineering* , 1998 , 85 (1) : 10-16.
- [11] Ha T L , Kitamoto N , Kawai K , akamizawa K , Suzuki T. Cloning and expression of a NAD⁺-dependent xylitol dehydrogenase gene (xdhA) of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* , 2004 , 97 : 419-422.
- [12] Machida M , Asai K , Sano M , Tanaka T , Kumagai T , Terai G , Kusumoto K , Arima T , Akita O , Kashiwagi Y , Abe K , Gomi K , Horiuchi H , Kitamoto K , Kobayashi T , Takeuchi M , Denning DW , Galagan JE , Nierman WC , Yu J , Archer DB , Bennett JW , Bhatnagar D , Cleveland TE , Fedorova ND , Osamu GO , Horikawa H , Hosoyama A , Ichinomiya M , Igarashi R , Iwashita K , Juvvadi PR , Kato M , Kato Y , Kin T , Kokubun A , Maeda H , Maeyama N , Maruyama J , Nagasaki H , Nakajima T , Oda K , Okada K , Paulsen I , Sakamoto K , Sawano T , Takahashi M , Takase K , Terabayashi Y , Wortman JR , Yamada O , Yamagata Y , Anazawa H , Hata Y , Koide Y , Komori T , Koyama Y , Minetoki T , Suharnan S , Tanaka A , Isono K , Kuhara S , Ogasawara N , Kikuchi H. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae* . *Nature* , 2005 , 438 (7071) : 1157-1161.
- [13] Lesk AM , NAD-binding domains of dehydrogenases. *Current Opinion Structure Biology* , 1995 , 5 (6) : 775-783.

Homology modeling and molecular docking of xylitol dehydrogenase from *Aspergillus Oryzae*

Hongwen Chen¹, Yuanbo Gou¹, Ka Zhang¹, Baishan Fang^{2*}

¹ Department of Bioengineering & Biotechnology, College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China

² College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract: [Objective] We investigated the structure model and function of xylitol dehydrogenase from *Aspergillus oryzae*. [Methods] Xylitol dehydrogenase (XDH) gene from *Aspergillus oryzae* was cloned and sequenced. We constructed four tertiary structure models of XDH by homology modeling with Swiss-MODEL and Modeller and obtained the best quality model by evaluation of PROCHECK and Prosa2003. The dockings of NAD⁺, Zn²⁺ and xylitol with XDH were performed by Molsoft program. [Results] Structure analysis suggested that XDH was a member of medium-chain dehydrogenase/reductase (MDR) family. This was supported by the presence of the zinc-containing alcohol dehydrogenase signature and a typical alcohol dehydrogenase Rossmann fold pattern composed by NAD⁺ binding domain present in MDR superfamily. The molecular docking indicated that amino acid residues Asp206, Arg211, Ser255, Ser301 and Arg303 in XDH binding domain had hydrogen bonding with NAD⁺, His72 and Glu73 in catalytic domain had hydrogen bonding with Zn²⁺, Ile46, Ile349, Lys350 and Thr351 in catalytic domain had hydrogen bonding with xylitol. [Conclusion] These key amino acid residues might play a vital role in the XDH catalytic reaction and can instruct the further directed modification of XDH.

Keywords: Xylitol dehydrogenase, *Aspergillus oryzae*, homology modeling, molecular docking

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (20676048), by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars of State Education Ministry (2010), by the Natural Science Foundation of Fujian Province (D0810015), by the New Century Excellent Talents in Fujian Province University (07FJRC03), and by the Basic Science Foundation of Huaqiao University

* Corresponding author. Tel: + 86-595-22692447, + 86-592-2185869; E-mail: chenhw@hqu.edu.cn, fbs@xmu.edu.cn

Received: 25 January 2011 / Revised: 29 March 2011

《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效!此项规定早已公布在本刊的网页上,并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。