

耐热碱性磷酸酶突变体耐热性变化机理研究

郁 锋 许晓风* 金 馨

(南京师范大学生命科学学院,南京 210097)

摘 要 从耐热碱性磷酸酶(TAP) 200 多个随机突变体的克隆库中选出耐热性明显下降的 4 株突变体,进行全序列及表达产物的最高耐受温度和最适反应温度测定和酶分子高级结构的模拟,分析突变位点、高级结构和耐热性表现三者的关系,探讨引起耐热性变化的机理。结构模拟显示所有突变位点都仅能引起细微的、局部的结构变化,除 T320→I 外都未直接接触及酶的活性中心,结构上的细微改变虽然对最适反应温度影响不明显,但却使最高耐受温度降低了 10℃左右;T320→I 靠近酶的活性中心,尽管未能引起结构的较大变化,但却使最高耐受温度和最适反应温度同时显著降低。可见,多数点突变对高级结构的影响都不剧烈,但对耐热性尤其是最高耐受温度的影响却比较明显,一般地,在非活性区的突变通常只能引起最高耐受温度的降低,靠近活性区的突变则能同时引起最适反应温度 and 最高耐受温度的降低。

关键词 耐热性,耐热碱性磷酸酶,三维结构模拟,突变体

中图分类号 Q61 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)04-0493-04

自从 1972 年发现第一株嗜热菌以来,已发现和分离到了 70 多种耐热的古细菌^[1],阐明这些菌内蛋白质和酶的耐热机理不仅有重要的理论意义,而且有潜在的应用价值,这方面已取得了一些研究进展。Mrabet 等^[2]发现 Arg 残基数的增加能增加蛋白质的热稳定性,并指出这可能是 Arg 有利于维持蛋白质中离子对净正电荷之故。Watanabe 等^[3]认为 Pro 可能通过减少蛋白质折叠状态的熵而提高热稳定性。季朝能、盛小禹等从栖热菌 *Thermus* sp. FD3041 中分离出一种胞内酶——耐热碱性磷酸酶(TAP) 由 501 个氨基酸组成,野生型的最适反应温度在 70℃以上,属典型的耐热酶^[4],并对耐热碱性磷酸酶的功能结构域进行了定位,并用定点突变的方法对活性位点 S(69) 两侧的 E 和 S 进行了研究^[6]。

然而,有关耐热酶的氨基酸组成-高级结构-耐热表现之间的关系究竟如何尚未得到十分明确的结论。本研究以 TAP 为研究对象,首先用 PCR 随机突变和添加化学诱变剂等方法^[7,8]产生大量随机突变体,进行全序列测定并克隆进高效表达载体,接着从这些突变体中选取耐热性表现出明显下降的两个单位点突变体(A410→T 和 P396→S,记为 TAP^{A410T} 和 TAP^{P396S})和两个多位点突变体(N100→S, T320→I 和 N100→S, P396→S, A410→V, P490→S 记为 TAP² 和 TAP⁴),分别测定它们的最适反应温度和最高耐受温度,然后采用分子模拟的方法模拟出野生型 TAP 及 4 个突变体酶蛋白的三级结构,根据它们的氨基酸序列组成、高级结构及耐热性的差异与相互关系,分析引起耐热性变化的机理。研究中之所以采用分

子模拟的方法来研究酶蛋白的三级结构,是由于这些酶蛋白很难得到晶体,精确的高级结构尚无法测定。分子模拟是在丹麦技术大学(Technical University of Denmark) CBS 中心的 CPHmodels 服务器^[9]上进行的,这是目前在 internet 上少数几个能提供从相容性序列查询到结构文件生成的蛋白质三级结构预测服务器之一,它使用的三级结构预测方法是现在流行的 Threading 方法。对于一般用户来说,利用网络浏览器就能完成预测工作,特别适合于用普通 PC 机进行蛋白质结构的预测。

1 材料与方法

1.1 材料

从已制备的 TAP 突变体克隆库中分别选取 TAP^{A410T}、TAP^{P396S}、TAP² 和 TAP⁴ 等 4 个突变体的高表达质粒 pJLA503 作为试验材料,野生型 TAP 质粒为对照,宿主菌 MPH44C(F' araD139D(ara-leu)7697Dlac-74 galUgalKrrpsID(phaA-phaC) phoR tsx::Tn5) CM Sepharose Fast Flow 购自 Pharmacia Biotech,其余药品均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 TAP 及其突变体的诱导表达和分离纯化:参见文献 [10]。

1.2.2 SDS-PAGE:以 SDS-PAGE 测定 TAP 及其突变体的分子量和纯度,选用 Laemmli 的高 pH 不连续缓冲体系,分离胶浓度为 10%。

1.2.3 TAP 及其突变体的浓度和活性测定: 浓度测定采用 Bradford 法; 活性测定使用 pNPP 为底物, 每离心管中加入 0.5 mL 反应溶液和 5 μ L 酶溶液, 在一定的温度下反应 10 min, 立刻取出加入 0.5 mL 的 0 $^{\circ}$ C 双蒸水, 冰浴冷却终止反应, 迅速在波长 405 nm 处测定黄色产物的光吸收值。

1.2.4 最适反应温度和最高耐受温度的测定: 测定酶的最适反应温度时, 先使用 90 $^{\circ}$ C、80 $^{\circ}$ C、75 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C 10 个温度梯度, 找到合适的范围后再使用更小的梯度直到 1 $^{\circ}$ C 为止。反应液先在反应温度下预热 2 min, 再加入酶液反应 10 min, 测定 OD 值。找出酶活最高时的温度定义为最适反应温度 T_{opt} 。

测定最高耐受温度时, 先使用 95 $^{\circ}$ C、90 $^{\circ}$ C、85 $^{\circ}$ C、80 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C 5 个温度梯度, 找到合适的范围后再使用更小的梯度直到 1 $^{\circ}$ C 为止。酶液在这些温度中水浴 30 min, 再 4 $^{\circ}$ C 保存 2 h, 然后在它们各自的最适反应温度下反应 10 min, 测定 OD 值。找出酶活下降为最适反应温度时酶活的一半的水浴温度定义为最高耐受温度 $T_{1/2}$ 。

1.2.5 TAP 三维结构的模拟和预测: 把 TAP 全序列提交到 http://www.cbs.dtu.dk/services/CPH_models/。在接收到查询序列之后, 服务器在蛋白结构核心数据库中进行查找, 确定查询序列和哪个已知结构的蛋白具有最大的相容性。然后根据该结构进行运算之后把查询序列的模拟三维结构以 web 页的方式返回, 同时创建了一个 PDB 格式的文件供下载保存。

1.2.6 TAP 突变体模拟结构的分析: 对 CBS 预测的 TAP 三维结构使用 Swiss-PDBViewer 软件^[11]观察, 对突变相应的位

点利用氨基酸有关的性质如表征氨基酸形成二级结构的能力的 Chou-Fasman 参数和化学反应活性等进行分析, 衡量这些突变位点对 TAP 酶整体耐热性的影响。

2 结果与分析

2.1 TAP 及其突变体的纯化

分离纯化后的 TAP 及其 4 个突变体在 SDS-PAGE 电泳中呈现单一条带 (Fig. 1), 分子量在 50kD 左右, 与由基因序列翻译所得蛋白分子量相符。

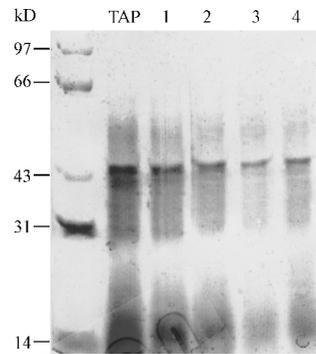


图 1 TAP 和 4 个突变体的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 1 SDS-PAGE of thermostable alkaline phosphatase and its mutants
1. TAP^{A410T}; 2. TAP^{P396S}; 3. TAP²; 4. TAP⁴

2.2 TAP 及其突变体最适反应温度和最高耐受温度的测定

TAP 及其突变体的最适反应温度和最高耐受温度测定结果见 Table 1。

表 1 野生型 TAP 和突变体的最适反应温度 T_{opt} 和最高耐受温度 $T_{1/2}$

Table 1 $T_{1/2}$ and T_{opt} of wild TAP and its mutants

Enzyme	Changed codon	Changed aa	$T_{opt}/^{\circ}$ C	$T_{1/2}/^{\circ}$ C	$T_{1/2}-T_{opt}/^{\circ}$ C
TAP			70 \pm 0.58	95 \pm 0.58	25
TAP ^{A410T}	GCC \rightarrow ACC	A410 \rightarrow T	70 \pm 1	85 \pm 0.58	15
TAP ^{P396S}	CCU \rightarrow UCU	P396 \rightarrow S	68 \pm 1.53	86 \pm 1	18
TAP ²	AAC \rightarrow AGC, ACC \rightarrow AUC	N100 \rightarrow S, T320 \rightarrow I	65 \pm 0.58	82 \pm 0	17
TAP ⁴	AAC \rightarrow AGC, CCU \rightarrow UCU, GCC \rightarrow GUC, CCC \rightarrow UCC	N100 \rightarrow S, P396 \rightarrow S, A410 \rightarrow V, P490 \rightarrow S	70 \pm 0.58	85 \pm 1	15

Note: T_{opt} is optimal reaction temperature; $T_{1/2}$ is highest tolerable temperature.

表 1 结果显示, 在最适反应温度方面 4 个突变体与野生型的表现基本一致, 仅 TAP² 的降低幅度达到统计上的显著水平, 可见在所有 6 个突变位点中与最适反应温度有关的位点仅有 N100 \rightarrow S 和 T320 \rightarrow I 两个, 甚至可能只有 T320 \rightarrow I 一个, 因为 N100 \rightarrow S 这一位点在 TAP⁴ 中并未引起最适反应温度的降低, 在最高耐受温度方面 4 个突变体都表现了显著的降低, 说明这些突变位点对最高耐受温度都有影响, 但最高耐受温度的变化与突变位点数并不成正比, 表明不同突变位点对最高耐受温度的影响程度不同。

从表 1 还可看出, $T_{1/2}-T_{opt}$ 值是上下波动的。表明 T_{opt} 和 $T_{1/2}$ 是衡量酶的耐热性的两个既有联系又不等同的概念, 两

者可同时变动但不成比例。

2.3 TAP 三维结构的模拟

经 CPHmodels 服务器的比对查询, 与 TAP 序列相容性最大的模板是大肠杆菌碱性磷酸酶 (BAP) 的一个突变体 (D153 \rightarrow H) A 链, 其 PDB 编号是 2ANH。两者有 207 个优化匹配, Z 值为 250.8, E 值为 5.1e-08。两者的主要差别表现在: TAP 在 A319 和 A398 之间比 2ANH 多出 66 个氨基酸, C 端也多出 30 个氨基酸。在结构模拟过程中, 服务器对于前一部分肽主链的走势作了预测但未给出详细的二级结构, 对 C 端作了截断处理, 由于 C 端已经远离酶的活性区, 对结构和功能的影响可能不是太大, 这样的处理是可以接受的。



图2 在 CPHmodels 服务器上模拟的 TAP 3D 结构

Fig.2 3D structure of TAP simulated on CPHmodels server

由 Fig.2 可以看出, TAP 的三维结构由 9 个 β -折叠的疏水核心和周围 11 个 α -螺旋组成。4 个突变体的整体三级结构基本相似(这里便不再列出)。对该模型采用 Ramachandran 图法^[12]进行评判, TAP 的主链二面角的 φ - ψ 除了 R63、E163 和 N160 落在 Ramachandran 图允许区之外,其余的都在允许区内,大部分落在核心区,说明这个模型是基本合理的。

2.4 三维结构中突变位点的影响分析

使用 PDBViewer 把 A410 附近的氨基酸显示出来,可以看到它们组成了一对反向 β 折叠 (V399-P405, M409-Q415)(Fig.3)。

由 Fig.3 可见, A410 虽然在 β 折叠中 (Fig.3a),但并不与其它氨基酸形成氢键,当该位点突变成 T 后 (Fig.3b),虽然同样与其它氨基酸形成氢键,但根据 Chou-Fasman 参数表^[13]的 P_{β} 值 (T: $P_{\beta} = 119$, A: $P_{\beta} = 83$) 进行推断,其形成 β 折叠的能力却有所增强。然而, TAP^{A410T} 的 T_{opt} 变化不大, $T_{1/2}$ 反而降低了 10℃。 $T_{1/2}$ 不升反降可能是由于 T 具有比 A 更活泼的羟基容易被高温氧化^[11]所致。

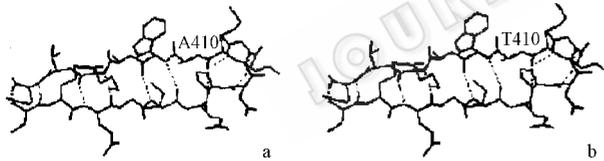


图3 A410 突变前后对它周围的 β 折叠结构的影响

Fig.3 Effects of amino acid 410 and its mutation on β -sheet

- β -sheet composed of A410 and its neighbors
- β -sheet composed of T410 and its neighbors

P 由于旋转自由度很小,在序列中会引起结构刚性的增加^[3]。4 个突变体中涉及 P 的有两个位点,即 P396 和 P490。P396 的 C 端后面就是 Fig.3 中所示的 β 折叠的开始处,它们在整个蛋白结构的顶部。P396 突变成 S 后,可能会影响到其比邻的 β 折叠的稳定性,结果导致 $T_{1/2}$ (10℃) 下降与 T_{opt} 轻微降低。N100 和它周围的氨基酸 (S96-S103) 形成一个 α 螺旋结构,如 Fig.4 所示。

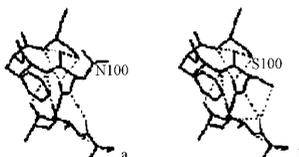


图4 N100 突变前后对它周围的 α 螺旋结构的影响

Fig.4 Effects of amino acid 100 and its mutation on β -sheet

- α -helices composed of N100 and its neighbors
- α -helices composed of S100 and its neighbors

从 Chou-Fasman 参数表的 P_{α} 值可以看到 (N: $P_{\alpha} = 67$) 和 S ($P_{\alpha} = 77$) 形成 α 螺旋的能力都比较弱,两者的疏水性也相似^[13],因此这个突变对耐热性的影响不大。引起 TAP² 耐热性降低的原因很可能是 T320→I 的突变,因为该突变很靠近 TAP 的活性中心 D317 和 H318(中间只隔了一个 A)。大肠杆菌碱性磷酸酶的同位点是 H。T 和 H 有相似的亲水性并且具有非烷烃的功能基团侧链,该活性中心区域本来适合形成环状结构,而 I 的疏水性是最强的 ($P_{\alpha} = 108$) 的引入使得该区域形成 α 螺旋的倾向大大增加,引起了该活性中心化学性质和结构的改变,从而同时降低了该突变体的 T_{opt} 和 $T_{1/2}$ 。

TAP⁴ 突变体尽管有 4 个氨基酸的替换,但由于 A410→V 的改变增强了该 β 折叠区域形成 β 折叠的能力,可能会部分抵消 P396→S 突变的影响,其耐热性的下降程度并不比其它突变体显著。暗示氨基酸相互间的作用对耐热性也会产生一定程度的影响。

3 讨论

综合以上的实验与分析结果,可以看出 TAP 的氨基酸序列组成、高级结构及耐热性表现三者之间存在着比较密切的联系,具体表现为:

1) 个别或少数氨基酸的替换一般只能引起酶高级结构的局部和细微的改变,但这种结构的细微改变却能引起耐热性尤其是最高耐受温度的明显变化。之所以出现这种情况,是因为蛋白质高级结构是靠所有氨基酸残基的各种弱键作用来维持的,每个氨基酸的贡献都有限,少数氨基酸变异所引起的弱键数量和能量的改变不足以对整个高级结构的根基造成动摇。事实上,这也符合蛋白质进化的总趋势,蛋白质在长期进化过程中,不仅结构和功能会日臻完善,而且应付突变的能力也应得到加强,其结构与功能不应因个别氨基酸的改变而崩溃。

2) 酶耐热性变化的程度和氨基酸替换发生的部位有关,非活性部位的替换通常只涉及最高耐受温度的变化,正如 TAP^{A410T}、TAP^{P396S} 和 TAP⁴ 所显示的那样,而活性部位的替换往往会同时涉及最适反应温度和最高耐受温度的变化如本试验中的 TAP²。

3) 最高耐受温度比最适反应温度更容易受到氨基酸突变的影响,这从本试验中引起最高耐受温度发生变化的突变位点占了绝大多数,而引起最适反应温度发生变化的突变位点仅 T320→I 一个的结果即可得到说明。最高耐受温度和最适反应温度虽然都是与温度有关的物化性质,且都可以用来有效衡量酶的耐热性,但它们却是既有联系又有区别的两个概念。前者是一个反映酶的全局能量状态的参数,描述酶在高温下抵抗热变性的能力,包括构象的变化和氨基酸残基的化学变化等。后者是一个反映酶活性区局部能量状态的参数,随着温度的增加,整个结构包括活性中心的结构都变得更柔软,当活性区的构象达到最适合于催化底物程度时的温度就是最适反应温度。由于最适反应温度肯定低于最高耐

受温度,处于这个温度时,酶不仅处于最佳的活性状态,而且各部分的构象也会处于一种理想状态,非活性区的突变由于不在活性位点,对酶活性区的最佳构象不会发生直接作用,但对酶的理想构象状态却会产生显著影响,这就是非活性区的突变一般只改变酶的最高耐受温度而不改变酶的最适反应温度的原因。

需要说明的是,上述结论中涉及酶高级结构的有关论断是根据计算机模拟的结构进行推断的,还必须经受进一步的实验检验。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Vieille C, Zeikus G J. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2001, **65**: 1-43
- [2] Mrabet N T, Van den Broeck A, Van den Brande I *et al.* Arginine residues as stabilizing elements in proteins. *Biochemistry*, 1992, **31**: 2239-2253
- [3] Watanabe K, Masuda T, Ohashi H *et al.* Multiple proline substitutions cumulatively thermostabilize *Bacillus cereus* ATCC7064 oligo-1, 6-glucosidase. *Eur J Biochem*, 1994, **226**: 277-283
- [4] SHENG X Y (盛小禹), WANG X (王曦), GAO J B (高静波) *et al.* Study on alkaline phosphatase from a thermophilic bacterial strain. *Chinese Biochemical Journal* (生物化学杂志), 1997, **13**(3): 672-676
- [5] JI C N (季朝能), SHENG X Y (盛小禹), JIANG T (姜涛) *et al.* Location on the functional domain of thermostable alkaline phos-

- phatase. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology* (中国生物化学与分子生物学报), 2001, **17**(1): 80-84
- [6] JI C N (季朝能), ZHANG H (张冰), JIANG T (姜涛) *et al.* Studies of the active site, thermostability and thermophilicity of thermostable alkaline phosphatase by Site-directed Mutagenesis. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), 2000, **27**(12): 1100-1107
- [7] Kironde F A, Parsonage D, Senior A E. Random mutagenesis of the gene for the beta-subunit of F1-ATPase from *Escherichia coli*. *Biochem J*, 1989, **259**(2): 421-426
- [8] Sikorski R S, Boeke J D. *In vitro* mutagenesis and plasmid shuffling: from cloned gene to mutant yeast. *Methods Enzymol*, 1991, **194**: 302-318
- [9] Lund O, Frimand K, Gorodkin J *et al.* Protein distance constraints predicted by neural networks and probability density functions. *Protein Engineering*, 1997, **10**(11): 1241-1248
- [10] JI C N (季朝能), SHENG X Y (盛小禹), BAI X Y (白晓阳) *et al.* Expression, purification and characteristic of thermostable alkaline phosphatase (TAPND27). *Journal of Fudan University, Natural Science* (复旦学报, 自然科学版), 2000, **39**(3): 297-301
- [11] Guex N, Peitsch M C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 1997, **18**: 2714-2723
- [12] Kleywegt G J, Jones T A. Phi/psi-chology: Ramachandran revisited. *Structure*, 1996, **4**: 1395-1400
- [13] Prevelige P, Fasman G D. Chou-Fasman prediction of secondary structure, in prediction of protein structure and the principles of protein conformation. New York: Plenum, 1989, pp. 1-91

Studies on the Mechanism of Thermostability and Thermophilicity Change of Thermostable Alkaline Phosphatase and Its Mutants

YU Feng XU Xiao-Feng* JIN Zhe

(College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract The relationship among the substituted amino acids, the 3D structure simulated on PC through CPHmodels Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>) and the thermostable performance of 4 thermostable alkaline phosphatase (TAP) mutants selected from a clone bank of more than 200 mutants were analyzed to explore the mechanism of thermostability change. These mutants are TAP^{A410T} (A410→T), TAP^{P396S} (P396→S), TAP² (N100→S, T320→I) and TAP⁴ (N100→S, P396→S, A410→V, P490→S). TAP and the mutants' thermostable performance was evaluated by measuring the highest tolerable temperature ($T_{1/2}$) and the optimal reaction temperature (T_{opt}). The 3D structure neighboring the substituted amino acids was simulated by Swiss-PDBViewer to observe the relationship between the structure change and the thermostable performance of TAP and its mutants. The results displayed that all these amino acid substitutions except the T320→I mutant brought about only a little local change on TAP's 3D structure and very little effect on their optimal reaction temperature, but a significant decrease (nearly 10°C) on their highest tolerable temperature. However, the T320→I mutation due to close to TAP's active sites did bring about a significant descendents of the mutant in both the highest tolerable temperature and the optimal reaction temperature. Thus, it seems to be able to conclude that most of the amino acid substitutions, no matter where they locate and what structure change they may make, can cause TAP's highest tolerable temperature reduced significantly. What's more, if the mutation occurring near or in the active sites, it can also cause TAP's optimal reaction temperature reduced significantly at the same time.

Key words thermostability, thermostable alkaline phosphatase, simulation of 3D structure, mutants