

多萜醇磷酸 β -葡萄糖基转移酶的活性和底物特异性分析

栗瑞杰, 胡芸, 尚尔菲, 高晓冬, 王宁*

江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

栗瑞杰, 胡芸, 尚尔菲, 高晓冬, 王宁. 多萜醇磷酸 β -葡萄糖基转移酶的活性和底物特异性分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1833-1844.

LI Ruijie, HU Yun, SHANG Erfei, GAO Xiaodong, WANG Ning. Analysis of enzyme activity and substrate specificity of dolichyl-phosphate β -glucosyltransferase[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1833-1844.

摘要: 内质网(endoplasmic reticulum, ER)是蛋白质折叠和质量控制的主要场所, 其内部驻留的分子伴侣能够帮助新生多肽链形成正确的三级结构。部分分子伴侣通过特异性识别葡萄糖基化的 *N*-寡糖结构与糖肽结合, 进而促进相应蛋白的折叠。作为 ER 腔内葡萄糖基化反应的糖基供体, 体外获取多萜醇磷酸葡萄糖(dolichol phosphate glucose, Dol-P-Glc)或其类似物对解析 *N*-寡糖生物合成途径及糖蛋白质量控制体系具有重要意义, 一直受到科学家们的关注。本研究以化学合成的一系列多萜醇(dolichol)类似物作为底物, 对大肠杆菌表达的阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*)来源的多萜醇磷酸 β -葡萄糖基转移酶 E (dolichyl-phosphate β -glucosyltransferase E, Alg5E)进行了研究。结果表明该重组蛋白在体外具有较强的催化活性, 可以识别不同链长的脂肪醇, 底物中脂肪醇碳链越长其酶促反应进程越快, 且对脂肪醇中异戊二烯的支链甲基表现出偏好性。研究还确认了重要的天冬氨酸-任意氨基酸-天冬氨酸(aspartate-any residue-aspartate, DXD)基序与二价金属离子的结合是该酶发挥催化功能的关键。上述工作为多萜醇寡糖(dolichol-linked oligosaccharide, DLO)合成途径中葡萄糖基转移酶 Alg6、Alg8 和 Alg10 的研究打下了基础。

关键词: 葡萄糖基转移酶; *N*-糖基化; 多萜醇; 底物特异性

资助项目: 国家自然科学基金(22077053, 32271342); 江苏省博士后科研资助计划(2020Z167)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22077053, 32271342) and the Jiangsu Planned Projects for Postdoctoral Research Funds (2020Z167).

*Corresponding author. E-mail: wangning@jiangnan.edu.cn

Received: 2023-10-24; Accepted: 2023-12-03

Analysis of enzyme activity and substrate specificity of dolichyl-phosphate β -glucosyltransferase

LI Ruijie, HU Yun, SHANG Erfei, GAO Xiaodong, WANG Ning*

School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Protein folding and quality control processes primarily occur in the endoplasmic reticulum (ER). ER-resident molecular chaperones play a crucial role in guiding nascent polypeptides towards their correct tertiary structures. Some of these chaperones specifically recognize glucosylated *N*-glycan moieties on peptide. It is of great significance to study the *N*-glycan biosynthetic pathway and glycoprotein quality control system by analyzing the sugar donor of ER luminal glucosyltransferases, known as dolichol phosphate glucose (Dol-P-Glc), or its analogues *in vitro*. In this study, we investigated a range of dolichol analogues to synthesize lipid phosphate glucose, which served as substrates for dolichyl-phosphate β -glucosyltransferase E (Alg5E) derived from *Trichomonas vaginalis*. The results demonstrated that the recombinant Alg5E, expressed in *Escherichia coli*, exhibited strong catalytic activity and the ability to recognize lipid phosphate glucose with varying chain lengths. Interestingly, the enzyme's catalytic reaction was found to be faster with longer carbon chains in the substrate. Additionally, Alg5E showed a preference for branched chain methyl groups in the lipid structure. Furthermore, our study confirmed the importance of divalent metal ions in the binding of the crucial DXD motif, which is essential for the enzyme's catalytic function. These findings lay the groundwork for future research on glucosyltransferases Alg6, Alg8, and Alg10 in the synthesis pathway of dolichol-linked oligosaccharide (DLO).

Keywords: glucosyltransferase; *N*-linked glycosylation; dolichol; substrate specificity

糖基化是蛋白质翻译后修饰的主要形式之一^[1],影响着蛋白质的理化性质和生物功能^[2]。真核细胞的 *N*-糖基化起始于内质网(endoplasmic reticulum, ER)中多萜醇寡糖(dolichol-linked oligosaccharide, DLO)前体的合成^[3-5]。DLO 合成首先发生在 ER 胞质侧,在糖基转移酶的作用下添加 5 个甘露糖(mannose, Man)生成中间体 Man5Gn2-PP-Dol^[6],翻转进入 ER 腔内后继续添加 4 个 Man 生成 Man9Gn2-PP-Dol,随后以多萜醇磷酸葡萄糖(dolichol phosphate glucose, Dol-P-Glc)为供体,由 Alg6、Alg8 和 Alg10 这 3 个葡萄糖基转移酶催化生成 Glc3Man9Gn2-PP-Dol^[7-9]。

糖链在寡糖基转移酶的催化下转移到新生多肽链特定序列的 Asn 残基上形成糖肽^[10]。ER 中分子伴侣钙连蛋白(calnexin, CNX)和钙网蛋白(calreticulin, CRT)参与的蛋白质质量控制会与新生多肽链结合^[11],促使糖蛋白的折叠。Hammond 等^[12]发现 *N*-糖链的葡萄糖基化具有重要的生物学意义,只有非还原端被 1 个葡萄糖修饰的 *N*-糖链可以被 CRT/CNX 识别而进入质量控制系统,引导新生糖肽的正确折叠。多萜醇磷酸 β -葡萄糖基转移酶(dolichyl-phosphate β -glucosyltransferase, Alg5)是单次跨膜的 GT-2 家族膜蛋白,驻留于内质网胞质一侧,在 DLO

前体的生物合成途径中催化葡萄糖(glucose, Glc) 残基从尿苷二磷酸葡萄糖(uridine diphosphate glucose, UDP-Glc)向多萜醇磷酸(dolichol phosphate, Dol-P)的转移, 生成 Dol-P-Glc(图 1)。Dol-P-Glc 作为糖基供体直接参与 *N*-糖链的葡萄糖基化, 因此 Dol-P-Glc 的获取和 Alg5 蛋白的研究对于理解蛋白质 *N*-糖基化修饰至关重要。

Dol-P-Glc 生物合成的研究可以追溯到 20 世纪 70 年代, Behrens 等^[13]发现大鼠肝微粒体膜成分中存在某种酶可以催化葡萄糖残基向脂质转移, 紧接着科学家们从多种组织和细胞中提取 ER 膜成分催化 Dol-P-Glc 的合成^[14-17]。1994 年, 研究人员首次在酿酒酵母中鉴定出编码多萜醇磷酸 β -葡萄糖基转移酶的基因 *alg5*^[18], 随后 Grabińska 等^[19]成功异源表达了阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*)来源的 Alg5E, 但该重组蛋白 N 端存在跨膜域, 表达量低、纯化困难, 而底物多萜醇(dolichol)需要从猪的肝脏中提取, 结构复杂、水溶性差, 这都限制了 Dol-P-Glc 的制备及相关研究。因此, 开发 Dol-P-Glc 的替代物及高效制备方法是进一步研究 DLO 合成途径的关键。近期, Bloch

等^[20]用化学方法合成了含有短链(25 个碳原子)脂肪醇的 Dol-P-Glc 类似物 Dol25-P-Glc, 并证明其可以作为葡萄糖基转移酶 Alg6 的糖基供体催化生成 Glc1Man9Gn2-PP-Dol, 但化学合成方法烦琐复杂, 涉及保护基团的选择和立体化学的控制, 导致生产效率不高。本实验室用含 20 个碳原子的脂肪醇植烷醇(phytanol)作为 dolichol 的替代物, 体外重构了 DLO 途径中生成 Man9Gn2-PP-Dol 的过程^[21], 因而推测 phytanol 也可以替代 dolichol 用于制备葡萄糖基化反应的糖基供体。本研究用包括 phytanol 在内的结构简单的脂肪醇代替 dolichol, 合成可以作为葡萄糖基转移酶供体的 Dol-P-Glc 类似物。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌质粒扩增菌株 DH5 α 、表达菌株 Rosetta(DE3)为实验室保存; 原核表达质粒 pET30a, 购于北京索莱宝科技有限公司; 引物合成、基因合成及基因测序, 由天霖生物科技有限公司完成。

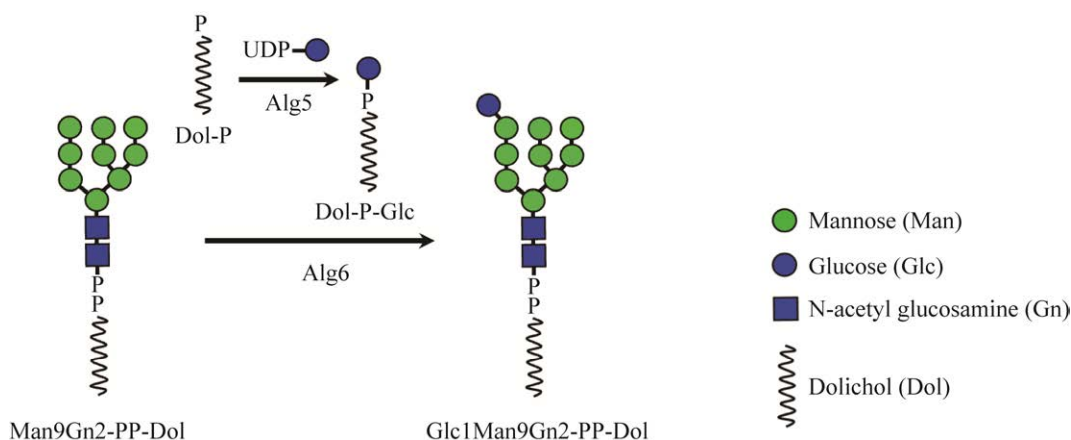


图 1 Alg5 催化 Dol-P-Glc 的生成及 Alg6 催化的葡萄糖基化反应

Figure 1 The formation of Dol-P-Glc is catalyzed by Alg5, and the glucosylation reaction is catalyzed by Alg6.

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10, 琼脂粉 20 (固体培养基); TB 培养基(g/L): 蛋白胨 12, 酵母提取物 24, 磷酸二氢钾 2.2, 磷酸氢二钾 9.4。121 °C 灭菌 15 min, 根据实验需要添加终浓度为 50 µg/mL 的卡那霉素(kanamycin, Kan)。

1.1.3 主要试剂

生物试剂: PrimerSTAR GXL 高保真 PCR 酶、BluePlusII Protein Marker、1 kb DNA Ladder、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Not* I, 购自宝生物工程(大连)有限公司; One Step Cloning Kit 同源重组酶, 购自南京诺维赞生物科技股份有限公司; Gel-green Plus 核酸染料、SDS-PAGE 蛋白凝胶制备试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒和免疫印迹检测抗体 Anti-His Mouse mAb 和 Goat Anti-Mouse IgG HRP, 购自上海碧云天生物技术有限公司; 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)、DNA 胶回收试剂盒和 DNA 小量抽提试剂盒, 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 核苷酸单糖 UDP-Glc, 购自武汉糖智药业有限公司。

1-十二烷醇(dodecanol, Dod)、法尼醇(farnesanol, Far)、1-十六烷醇(hexadecanol, Hex)、茄尼醇(solanesol, Sol)、二甲胺和磷酸二氢四叔丁基, 购自 Adamas 公司^[22-23]; 植醇(phytol)、三氯乙腈和(*S*)-binap-RuCl₂ (p-cymene), 购自 TCI 公司; TLC 硅胶板, 购自 Merck 公司; 阳离子交换树脂(AG 50W-X8), 购自 Bio-Rad 公司。

其他常用试剂购自中国国药集团。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pET30a-*alg5eΔTM* 和点突变质粒的构建

从 Uniprot 中找到 *T. vaginalis* 来源的 Alg5E 蛋白序列, 用 NCBI 的 TBLASTN 工具检索得到

Alg5E 核苷酸序列, 全长 978 bp。用 DeepTMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>) 进行蛋白质跨膜结构域分析, 截断跨膜域后从 79 bp 开始基因合成, 并在 5'端和 3'端分别引入 CCATG GCTGATATCGGATCC 和 GCGGCCGCACTCG AGCACCA 各 20 bp 的同源臂。将 pET30a 空载体用 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切, 产物经胶回收后以 20 ng 基因片段, 5 ng 空载体片段, 1 µL One Step Cloning Kit 重组酶, 加水补足 5 µL 体系, 50 °C 反应 10 min。转化大肠杆菌 DH5α 感受态后从平板挑取单克隆进行菌落 PCR 验证, 筛选出阳性单克隆后进行测序确认。在原质粒的基础上用重叠延伸 PCR 技术进行基因的定点突变, 筛选出单克隆进行测序确认。

1.2.2 重组蛋白 Alg5E-ΔTM 的表达和纯化

将重组质粒 pET30a-*alg5eΔTM* 转入大肠杆菌 Rosetta(DE3)感受态细胞, 预培养 40 min 后涂布于 LB (Kan⁺) 固体平板上, 37 °C、220 r/min 摇床培养 12 h, 挑取单菌落接种于 5 mL LB (Kan⁺) 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 摇床过夜培养后, 按 1% 的接种量接入 200 mL TB (Kan⁺) 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 培养 3 h 至 *OD*₆₀₀ 约 0.8 后转入 16 °C 摇床继续培养 1 h, 加入终浓度为 100 µmol/L 的 IPTG, 16 °C、220 r/min 诱导 18 h 后于 4 °C、8 000 r/min 离心 3 min 收集菌体。

菌体重悬于 15 mL 预冷 Buffer I (25 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 体积分数 5% 的甘油, 体积分数 0.3% 的 Triton X-100, pH 8.0), 冰浴超声波破碎 15 min, 收集 9 000 r/min 离心 30 min 的上清, 上样于 HisTrap HP 1 mL 镍亲和层析柱, 先用 Buffer I 平衡 5 mL, 再分别用含 50、120、250 mmol/L 咪唑的 Buffer I 梯度洗脱, 取样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳考染检测目的蛋白后, 用超滤管进行除盐和浓缩。

1.2.3 蛋白质 SDS-PAGE 考染和免疫印迹

装配电泳装置, 放置凝胶, 取适量蛋白质样品加入 Loading Buffer 混匀, 95 °C 加热 5 min 上样, 90 V 恒压电泳 20 min, 160 V 恒压电泳 50 min 后结束, 考马斯亮蓝染液室温染色 1 h 后通过热水浴脱色检测。蛋白质印迹实验步骤: 取电泳完成的 SDS-PAGE 凝胶转 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 一抗 Anti-His Mouse mAb 稀释 5 000 倍室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 二抗 Goat Anti-Mouse IgG HRP 稀释 8 000 倍室温孵育 1 h, TBST 洗尽后用 ECL 显色剂显色, 放入凝胶成像仪曝光查看结果。

1.2.4 Alg5E 天然底物类似物的合成

不饱和脂肪醇 farnesanol 和 phytol 的还原、solanesol 的不对称加氢以及饱和脂肪醇的磷酸化根据本实验室现有的实验路线完成。其中 farnesanol 和 phytol 的还原方法为^[24-25]: 氢气环境下, 取 farnesanol 或 phytol 原料(400 mg)与 5% 碳负载铂(20 mg)溶于 5 mL 无水乙醇中, 室温搅拌反应过夜, 薄层色谱法(thin-layer chromatography, TLC)监测反应进程。反应结束后过滤去除催化剂, 旋蒸去除溶剂后通过柱色谱法纯化, 洗脱剂为 V(甲醇):V(二氯甲烷)=20:1, 得到透明油状物 *S*-法尼醇(*S*-farnesanol, *S*-Far)和 phytanol; solanesol 不对称加氢方法为: 氮气环境下, solanesol (50 mg, 80 μ mol)原料溶于 0.8 mL 无水异丙醇中, 依次加入(*S*)-binap-RuCl₂ (p-cymene) (4 mg, 2.38 μ mol)和 KOH (14 mg, 159 μ mol), 83 °C 反应 4 h, 旋蒸去除溶剂后通过柱色谱法纯化, 洗脱剂为 V(甲醇):V(二氯甲烷)=20:1, 得到淡黄色油状物 *S*-茄尼醇(*S*-solanesol, *S*-Sol)。脂肪醇磷酸化的方法为: 在氮气环境下, 取 dodecanol、*S*-farnesanol、hexadecanol、phytanol 或 *S*-solanesol 原料(0.5 mmol)与磷酸二氢四叔丁基(0.33 g, 1 mmol)溶于 5 mL 无水二氯甲烷溶液

中, 快速加入 0.3 mL 三氯乙腈, 室温搅拌 20 min 后旋蒸去除溶剂。复溶于 3 mL 四氢呋喃中, 加入 200 μ L 的 25% 氨水继续反应 45 min, 加入 5 mL 甲醇:甲苯(体积比为 1:1)混合溶液搅拌 20 min 终止反应。旋蒸去除溶剂后通过柱色谱法纯化, 洗脱剂为 V(甲醇):V(二氯甲烷):V(1% 氨水)=80:10:1, 得到粗产物, 再用离子交换色谱(AG 50W-X8)纯化后分别得到 1-十二烷醇磷酸(dodecanol phosphate, Dod-P)、*S*-法尼醇磷酸(*S*-farnesanol phosphate, *S*-Far-P)、1-十六烷醇磷酸(hexadecanol phosphate, Hex-P)、植烷醇磷酸(phytanol phosphate, Phy-P)、*S*-茄尼醇磷酸(*S*-solanesol phosphate, *S*-Sol-P)。

1.2.5 重组蛋白 Alg5E- Δ TM 的活性检测和底物特异性检测

标准的酶反应条件如下(50 μ L 体系): 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 10 mmol/L MgCl₂, 体积分数为 1% 的 NP-40, 1.6 mmol/L Phy-P, 8 mmol/L UDP-Glc 和 1 mg/mL Alg5E- Δ TM 蛋白, 30 °C 孵育 30 min 后, 95 °C 高温加热 10 min 灭活蛋白进行检测。活性检测采用的方法为 TLC 和电喷雾质谱法(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)。具体方法如下: TLC 检测时用 0.3 mm 毛细管取少量反应体系点于硅胶板上, 吹干后浸入展开剂(氯仿:甲醇:水=11:5:1, 体积比), 溶剂前沿到全板长 4/5 处取出, 浸于乙醇:硫酸(体积比为 19:1)溶液中, 高温加热显色; ESI-MS 检测方法: 取 1 μ L 反应体系, 加入 49 μ L 水中制成混合溶液, 以甲醇为流动相进样分析。酶的底物特异性实验中, 在标准酶反应体系的基础上, 用 5 种不同碳链长度的脂肪醇磷酸化后作为底物进行平行实验, TLC 监测 10 min 和 30 min 反应进程, 用 Tanon Image 软件量化 TLC 结果中的反应转化率, 以 Phy-P 转化率为单位 1, 其他底物转化率除以 Phy-P 转化率得到相对转化率绘制柱状图。

2 结果与分析

2.1 重组蛋白 Alg5E- Δ TM 的可溶性表达与纯化

利用在线软件 DeepTMHMM 对阴道毛滴虫来源的 Alg5E 蛋白进行跨膜结构域预测,结果显示 Alg5E 含有 1 个跨膜域(6-26 位氨基酸)。本实验截断 *alg5e* 基因前 78 bp 编码 1-26 位氨基酸的序列,构建重组质粒 pET30a-*alg5e* Δ TM (图 2A)。将合成的目的基因 *alg5e* Δ TM (940 bp)与空载 pET30a 连接,转化后进行菌落 PCR 验证,挑取阳性菌落扩培并抽提质粒进行测序,测序结果与 GenBank 中 *alg5e* 基因 79-978 bp 编码区核苷酸序列一致,说明重组质粒构建成功。

将重组质粒 pET30a-*alg5e* Δ TM 转入大肠杆菌 Rosetta (DE3), IPTG 低温诱导 18 h 后,收集的菌体超声波破碎,离心后上清液用镍亲和层析柱纯化,用含不同浓度咪唑的 Buffer I 梯度

洗脱后将含 250 mmol/L 咪唑 Buffer I 的洗脱液浓缩,脱盐后得到质量浓度 20 mg/mL 的重组蛋白。纯化后的蛋白样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳后染色验证,发现接近 40 kDa 处出现 1 条明显的蛋白条带,与重组蛋白 Alg5E- Δ TM 的理论大小 38 kDa 一致(图 2B),蛋白质免疫印迹实验检测也发现,相比于诱导前,纯化后的蛋白在约 38 kDa 处有清晰的特异性条带(图 2C)。这表明重组蛋白 Alg5E- Δ TM 成功地在大肠杆菌中可溶性表达并进行了纯化。

2.2 重组蛋白 Alg5E- Δ TM 的活性分析

用含 20 个碳原子的脂肪醇 phytanol 代替 dolichol,磷酸化后作为重组蛋白 Alg5E- Δ TM 的底物进行了催化实验(图 3A)。从图中可以看出,相比于条带 1 中比移值(retention factor value, Rf)为 0.45 的底物点 Phy-P,催化体系(条带 3)出现了 1 个 Rf 值为 0.40 产物点,理论产物

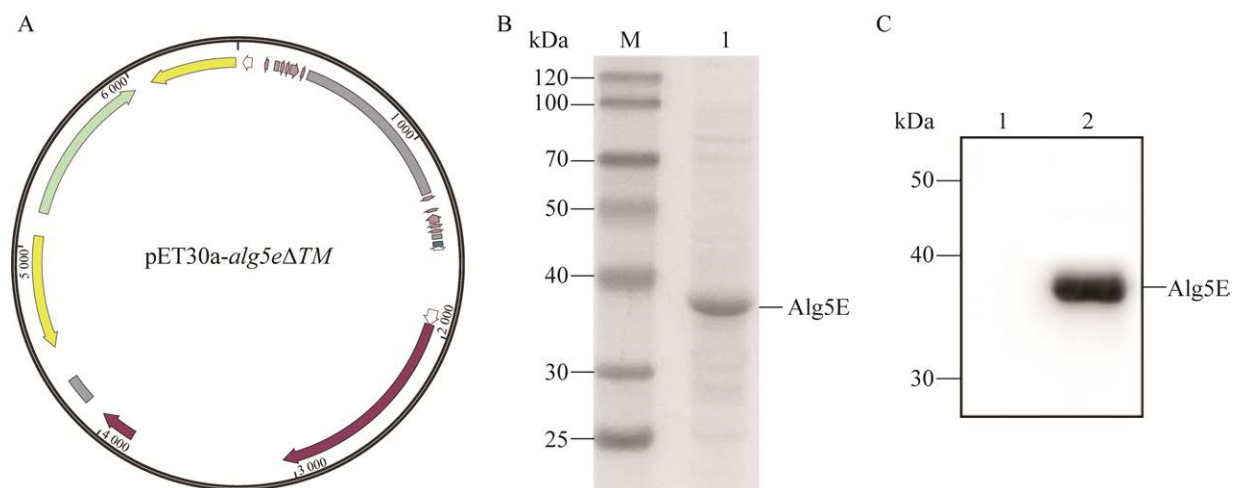


图 2 重组蛋白 Alg5E- Δ TM 的表达和纯化 A: 重组质粒 pET30a-*alg5e* Δ TM 示意图. B: Alg5E 纯化结果图. M 为 Blue Plus II Marker; 条带 1 为纯化后的 Alg5E- Δ TM. C: Alg5E 诱导表达 Western blotting 结果图, anti-His. 条带 1 为诱导前蛋白; 条带 2 为纯化后的 Alg5E- Δ TM

Figure 2 Expression and purification of Alg5E- Δ TM protein. A: Schematic diagram of recombinant plasmid pET30a-*alg5e* Δ TM. B: Alg5E purification results. M represents Blue Plus II Marker; Lane 1 represents purified Alg5E- Δ TM. C: Western blotting result of Alg5E expression and anti-His. Lane 1 represents pre-induction protein; Lane 2 represents purified Alg5E- Δ TM.

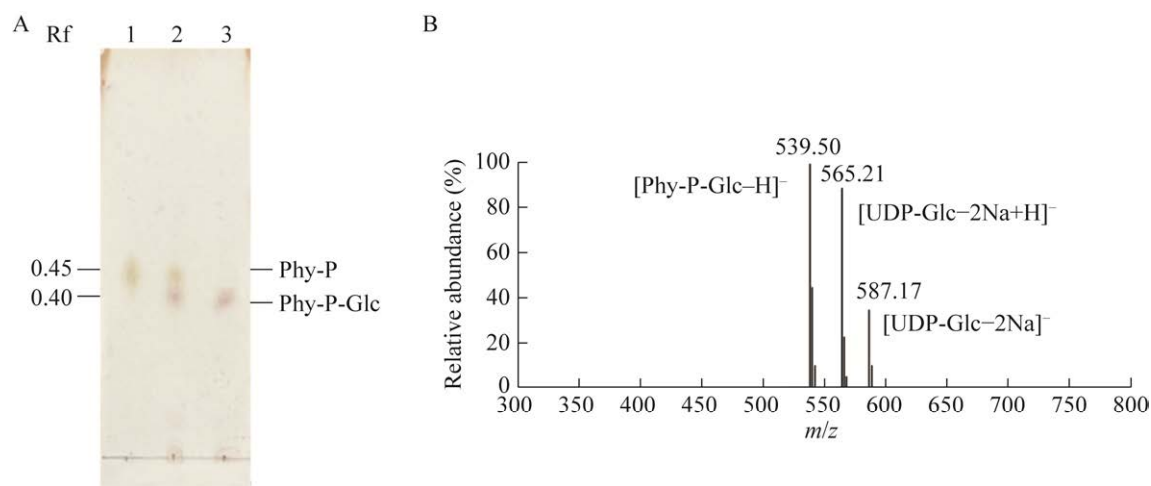


图 3 重组蛋白 Alg5E- Δ TM 活性检测 A: Alg5E 反应 TLC 结果图. 条带 1 为底物 Phy-P; 条带 2 为 1 和 3 的混点; 条带 3 为产物 Phy-P-Glc. B: Alg5E 反应 ESI-MS 结果图

Figure 3 Alg5E- Δ TM activity detection. A: TLC result of Alg5E reaction. Lane 1 represents the substrate Phy-P; Lane 2 represents the mixing point of 1 and 3; Lane 3 represents the product Phy-P-Glc. B: ESI-MS result of Alg5E reaction.

Phy-P-Glc 对比 Phy-P 引入了 1 个亲水性的基团 Glc, 极性变大并导致展开时迁移率下降, Rf 值减小, 这与 TLC 结果相符。目标产物的生成通过质谱进一步确定, Phy-P-Glc 分子量为 540.5、ESI-MS 阴离子模式下质荷比 m/z 为 539.5 的 1 组峰对应了目标产物 [Phy-P-Glc-H]⁻ 形式的加合离子峰, 另外 2 组峰分别对应了供体底物 UDP-Glc [UDP-Glc-2Na+H]⁻ 和 [UDP-Glc-Na]⁻ 2 种形式的加合离子峰(图 3B)。催化体系的 TLC 结果和 ESI-MS 结果均未看到底物 Phy-P, 说明重组蛋白 Alg5E- Δ TM 能完全催化 Phy-P 生成 Phy-P-Glc, 反应转化率 100%, 体外催化效率高。

2.3 重组蛋白 Alg5E- Δ TM 金属离子依赖性研究

天冬氨酸-任意氨基酸-天冬氨酸(aspartate-any residue-aspartate, DXD)基序是包含 2 个天冬氨酸特征的短序列, 往往作为酶的活性中心, 与金属离子相互作用发挥催化功能。目前大量的研究表明糖基转移酶(glycosyltransferase, GT)

A 折叠(GT-A)结构域含有保守的 DXD 基序。通过 CAZy 数据库的检索得知, Alg5 蛋白属于糖基转移酶家族 2 (glycosyltransferase family 2, GT2), 采用 GT-A 方式折叠, 理论上酶的催化功能需要金属离子与 DXD 基序相互作用激活^[26]。对比不同来源的 Alg5 蛋白氨基酸序列发现, Alg5E 的 169-171 位氨基酸存在 1 个保守性 DXD 基序(图 4A)。将 Mg²⁺与蛋白质 Alg5E- Δ TM 进行配位预测, 结果显示该 DXD 基序是 1 个潜在的金离子结合位点, D169 和 D171 倾向于与 Mg²⁺形成配位键(图 4B)。因此设计了重组蛋白 Alg5E- Δ TM 的 2 个突变体 D169A 和 D171A, 成功地原核表达并纯化后(图 4C)分别测试了活性。从 TLC 结果(图 4D)可以看到, 相比于条带 1 野生型(wild type, WT), 2 个突变体(条带 2 和条带 3)反应体系没有产物 Phy-P-Glc 生成, 表明 DXD 基序中任何 1 个天冬氨酸残基对于酶活都是必不可少的。此外, 加入 EDTA 的反应体系也没有检测到产物的生成, 证明 DXD 基序与二价金

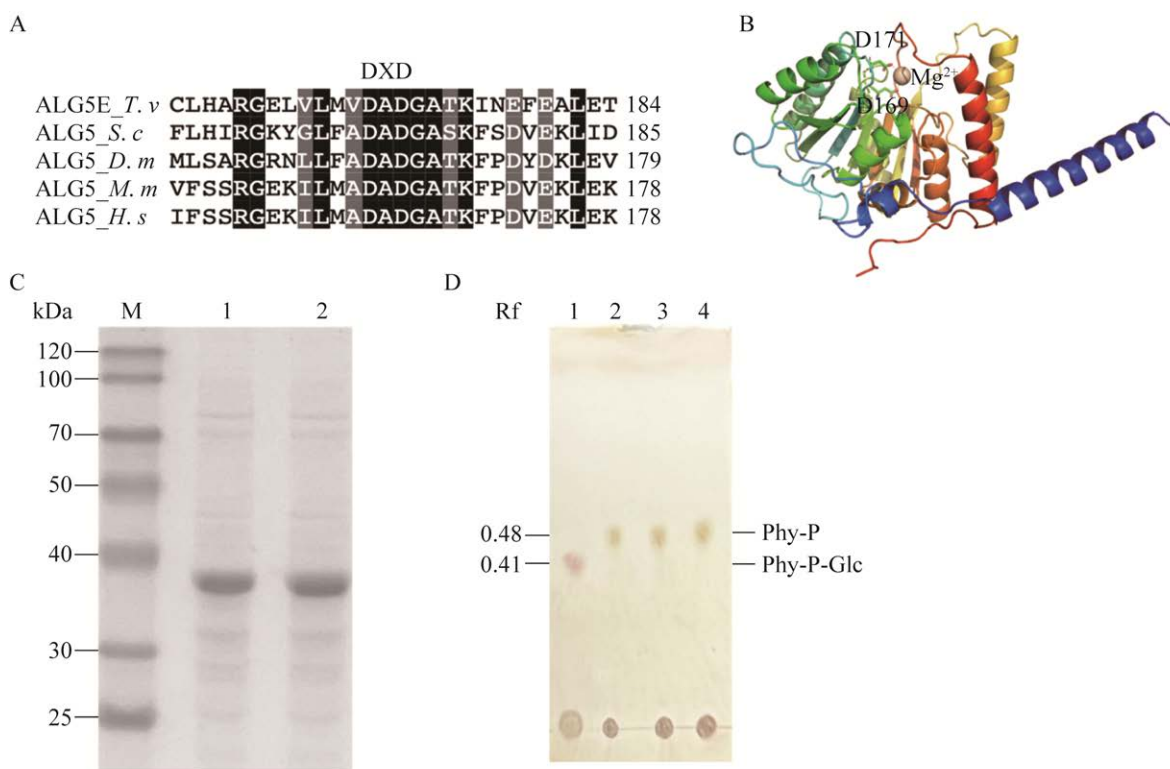


图 4 重组蛋白 Alg5E- Δ TM 金属离子依赖性分析 A: 不同物种 Alg5 蛋白同源性分析. *T. v* 代表阴道毛滴虫来源; *S. c* 代表酿酒酵母来源; *D. m* 代表果蝇来源; *M. m* 代表小鼠来源; *H. s* 代表人源. B: Mg²⁺ 与 Alg5 的 DXD 基序络合预测示意图. C: Alg5E- Δ TM 突变体纯化结果. 条带 1 为 D169A; 条带 2 为 D171A. D: Alg5E 酶促反应 TLC 结果图. 条带 1 为 WT; 条带 2 为 D169A; 条带 3 为 D171A; 条带 4 为反应体系中加入 10 mmol/L 的 EDTA

Figure 4 Recombinant protein Alg5E- Δ TM metal ion dependence. A: Alignment of Alg5 proteins from different species. *T. v* represents *T. vaginalis*; *S. c* represents *Saccharomyces cerevisiae*; *D. m* represents *Drosophila melanogaster*; *M. m* represents *Mus musculus*; *H. s* represents *Homo sapiens*. B: Schematic diagram of the predicted Alg5 DXD motif complexation with Mg²⁺. C: Purification results of Alg5E- Δ TM mutants. Lane 1 represents D169A; Lane 2 represents D171A. D: TLC results of Alg5E reaction. Lane 1 represents WT; Lane 2 represents D169A; Lane 3 represents D171A; Lane 4 is the reaction system in the presence of 10 mmol/L EDTA.

属离子的结合对于重组蛋白 Alg5E- Δ TM 的活性至关重要, 进一步说明了 DXD 基序中的天冬氨酸作为催化基团在酶催化反应中发挥的关键作用。

2.4 重组蛋白 Alg5E- Δ TM 底物特异性研究

Alg5E 天然底物中的 dolichol 有 16 个异戊二烯单元, 水溶性差且难以制备。本研究用含 4 个异戊二烯单元的脂肪醇 phytanol 作为 dolichol 的替代物, 磷酸化得到 Phy-P 作为重组

蛋白 Alg5E- Δ TM 的底物制备了 Phy-P-Glc。为了研究受体底物脂肪醇碳链长度对酶促反应的影响, 制备了不同碳链长度的脂肪醇, 包括含 12 个碳原子的 dodecanol、含 15 个碳原子的 *S*-farnesanol、含 16 个碳原子的 hexadecanol、含 20 个碳原子 phytanol 和含 45 个碳原子 *S*-solanesol (图 5A)。将脂肪醇磷酸化后分别进行了催化实验。

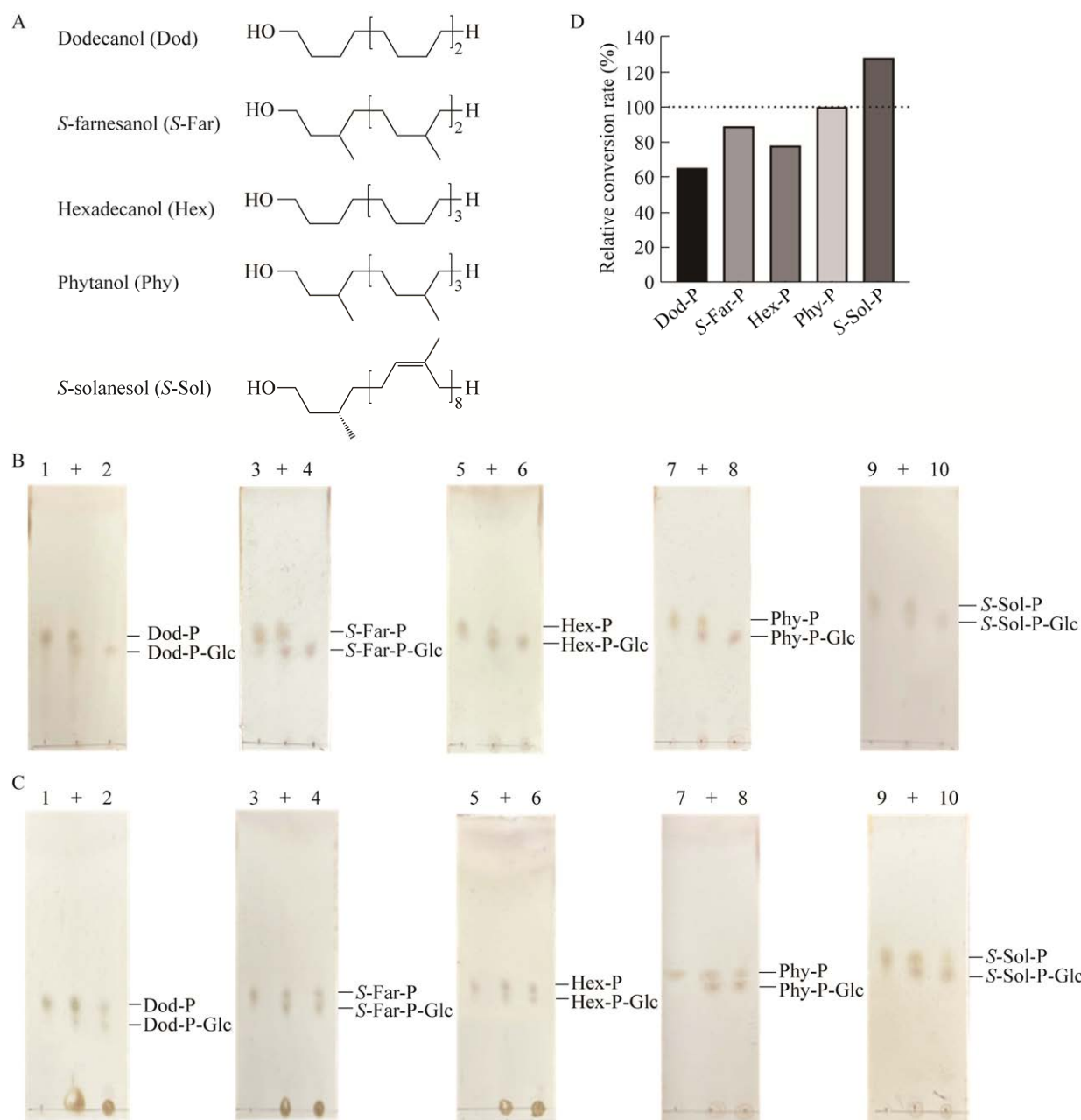


图 5 重组蛋白 Alg5E- Δ TM 底物特异性分析 A: 不同碳链长度的脂肪醇结构图. B: 反应 30 min 结果图. C: 反应 10 min 结果图. 数字 1、3、5、7 和 9 分别对应底物 Dod-P、*S*-Far-P、Hex-P、Phy-P 和 *S*-Sol-P; 数字 2、4、6、8 和 10 为各自底物参与的催化体系; 符号“+”代表混点. D: 不同底物反应 10 min 各相对转化率, 以 Phy-P 的转化率 54% 为单位 1, 其他底物的转化率除以 54% 计算相对转化率作图

Figure 5 Substrate specificity analysis of Alg5E- Δ TM. A: Lipid substrates with different chain length. B: 30 min reaction results. C: 10 min reaction results. Numbers 1, 3, 5, 7, and 9 correspond to the substrates Dod-P, *S*-Far-P, Hex-P, Phy-P, and *S*-Sol-P, respectively; Numbers 2, 4, 6, 8, and 10 are the catalytic systems of the respective substrates; The symbols “+” represent the mixing points. D: The relative conversion rates of different substrates for 10 min reaction, the conversion rate of Phy-P is 54% as unit 1, and the conversion rates of other substrates are divided by 54% to calculate the relative conversion rates for the graphs.

从图 5B 可以看到, 反应 30 min 的体系中, 条带 2、4、6、8 和 10 (分别对应 Dod-P、S-Far-P、Hex-P、Phy-P 和 S-Sol-P 催化反应) 均出现了与底物不同的新斑点, 表明 5 种底物都完全转化成产物脂肪醇磷酸葡萄糖, 一方面证明 Alg5E- Δ TM 催化效率高, 在温和条件下短时间内就能以 100% 的转化率生成目标产物; 另一方面也说明该重组蛋白的底物特异性差, 可以识别从含 80 个碳的天然底物 dolichol 到含 12 个碳的类似物 dodecanol, 这给予了体外酶法合成脂肪醇磷酸葡萄糖更多的底物选择性。

从反应 10 min 的体系中可以看到, 条带 2、4、6、8 和 10 均同时存在底物和产物斑点, 表明此时各体系的脂肪醇底物都没有完全反应 (图 5C)。转化率量化后的结果如图 5D 所示, Dod-P 相对转化率最低, 为 65.5%, S-Sol-P 相对转化率最高, 为 127.4%。相对转化率与脂肪醇底物的链长整体呈正相关, 说明在天然底物链长范围内, Alg5E- Δ TM 酶促反应速率随着脂肪醇底物碳链的延长而变快。但 S-Far-P 底物 89% 的相对转化率高于碳链更长的 Hex-P 底物 (78.1%), 对比 S-Far-P 和 Hex-P 的结构发现, S-Far-P 的脂肪链含 15 个碳原子, 略少于 Hex-P 中的 16 个碳原子, 但 S-Far-P 异戊二烯单元多 1 个支链甲基, 支链结构更复杂, 这表明了 Alg5E- Δ TM 对脂肪醇底物中异戊二烯的支链甲基的偏好性。推测可能是由于结构复杂的脂肪醇更容易与蛋白质底物结合口袋的某些氨基酸相互作用, 得到更高的催化效率, 这为后续进行葡萄糖基转移酶 Alg6、Alg8 和 Alg10 的研究打下了基础。

3 讨论与结论

蛋白质 *N*-糖基化过程中葡萄糖基转移酶的供体为 Dol-P-Glc, 由 Alg5 催化 Dol-P 与

UDP-Glc 生成^[8-9]。在早期的研究中, Grabińska 等^[19]发现 *T. vaginalis* 有 5 个 Alg5 的同源蛋白 (Alg5A、Alg5B、Alg5C、Alg5D 和 Alg5E), 其膜成分可以体外催化 Dol-P-Glc 的生成, 且活性约为酿酒酵母膜的 300 倍。在酿酒酵母细胞中表达这 5 个同源蛋白进行活性测定, 发现 5 个重组蛋白都表现出很高的催化活性, 其中 Alg5E 的表达水平更高。随后在大肠杆菌细胞中表达了 Alg5E, 从猪肝中提取天然 dolichol 作为底物, 鉴定了体外催化活性。该研究用含 Alg5E 蛋白的微粒体膜成分进行催化实验时, 加入 EDTA 螯合金属离子后仍检测到产物的生成, 得出了酶促反应不依赖于二价金属离子的结论。本文对纯化的 Alg5E- Δ TM 蛋白进行了金属离子依赖性研究, 实验测得重组蛋白 DXD 基序中天冬氨酸突变会导致酶活完全丧失, 表明酶促反应需要二价金属离子的参与。对于实验结论的差异, 推测可能是由于微粒体膜成分比较复杂, Grabińska 等^[19]的实验中加入 EDTA 后没有将全部的金属离子螯合, 还存在膜包埋的金属离子可以与蛋白发生相互作用, 激活了酶的催化功能。

此外, 由于天然底物 dolichol 提取的工艺繁琐、效率较低, 难以被用作最适底物进行广泛应用, 限制了葡萄糖基供体 Dol-P-Glc 的制备和 DLO 生物合成途径的相关研究。近期, Bloch 等^[20]证明了含短链脂肪醇的天然 Dol-P-Glc 类似物可以作为供体参与高甘露糖型 *N*-寡糖的葡萄糖基化反应。本文对 Alg5E- Δ TM 底物特异性的研究, 证明了该重组蛋白可以识别含 45 个碳的底物 S-Sol-P 以及短至含 12 个碳的底物 Dod-P, 30 min 就能以 100% 的转化率催化 UDP-Glc 中葡萄糖残基向不同链长脂肪醇磷酸底物的转移, 合成可以作为葡萄糖基转移酶供体的 Dol-P-Glc 类似物, 为体外重构完整的 DLO

合成途径提供了条件。此外, Alg5E- Δ TM 对脂肪醇底物中异戊二烯支链甲基偏好性的发现也为进一步探究 Alg5E 蛋白结构与功能之间的关系提供了更深层次的理解。

综上所述, 本研究利用大肠杆菌表达的 Alg5E- Δ TM 蛋白, 以天然 dolichol 的类似物 phytanol 作为底物, 成功合成了结构简单、水溶性好的 Phy-P-Glc。研究发现 Alg5E- Δ TM 可以识别含 45 个碳的天然底物 dolichol 类似物, 以及短至含 12 个碳的类似物, 酶促反应速率随着脂肪醇碳链的延长而变快, 并且对脂肪醇中异戊二烯的支链甲基表现出偏好性。此外, 研究确认了 Alg5E- Δ TM 中与二价金属离子结合的 DXD 基序在酶发挥催化功能中起到的关键作用。研究中合成的 Phy-P-Glc 等 Dol-P-Glc 类似物可以作为糖基供体参与 *N*-寡糖的组装, 为 DLO 合成途径中葡萄糖转移酶 Alg6、Alg8 和 Alg10 的研究奠定基础。

REFERENCES

- [1] AEBI M, BERNASCONI R, CLERC S, MOLINARI M. *N*-glycan structures: recognition and processing in the ER[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2010, 35(2): 74-82.
- [2] CHEREPANOVA N, SHRIMAL S, GILMORE R. *N*-linked glycosylation and homeostasis of the endoplasmic reticulum[J]. Current Opinion in Cell Biology, 2016, 41: 57-65.
- [3] BREITLING J, AEBI M. *N*-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2013, 5(8): a013359.
- [4] JARRELL KF, DING Y, MEYER BH, ALBERS SV, KAMINSKI L, EICHLER J. *N*-linked glycosylation in archaea: a structural, functional, and genetic analysis[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2014, 78(2): 304-341.
- [5] TOUSTOU C, WALET-BALIEU ML, KIEFER-MEYER MC, HOUDOU M, LEROUGE P, FOULQUIER F, BARDOR M. Towards understanding the extensive diversity of protein *N*-glycan structures in eukaryotes[J]. Biological Reviews, 2022, 97(2): 732-748.
- [6] GAO XD, NISHIKAWA A, DEAN N. Physical interactions between the Alg1, Alg2, and Alg11 mannosyltransferases of the endoplasmic reticulum[J]. Glycobiology, 2004, 14(6): 559-570.
- [7] BECK PJ, ORLEAN P, ALBRIGHT C, ROBBINS PW, GETHING MJ, SAMBROOK JF. The *Saccharomyces cerevisiae* *dpml* gene encoding dolichol-phosphate-mannose synthase is able to complement a glycosylation-defective mammalian cell line[J]. Molecular and Cellular Biology, 1990, 10(9): 4612-4622.
- [8] ALBUQUERQUE-WENDT A, HÜTTE HJ, BUETTNER FFR, ROUTIER FH, BAKKER H. Membrane topological model of glycosyltransferases of the GT-C superfamily[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(19): 4842.
- [9] MOHANTY S, CHAUDHARY BP, ZOETEWY D. Structural insight into the mechanism of *N*-linked glycosylation by oligosaccharyltransferase[J]. Biomolecules, 2020, 10(4): 624.
- [10] CHINO H, MIZUSHIMA N. ER-phagy: quality control and turnover of endoplasmic reticulum[J]. Trends in Cell Biology, 2020, 30(5): 384-398.
- [11] RUDDOCK LW, MOLINARI M. *N*-glycan processing in ER quality control[J]. Journal of Cell Science, 2006, 119(21): 4373-4380.
- [12] HAMMOND C, BRAAKMAN I, HELENIUS A. Role of *N*-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91(3): 913-917.
- [13] BEHRENS NH, LELOIR LF. Dolichol monophosphate glucose: an intermediate in glucose transfer in liver[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1970, 66(1): 153-159.
- [14] HERSCOVICS A, BUGGE B, JEANLOZ RW. Glucosyltransferase activity in calf pancreas microsomes. Formation of dolichyl D- 14 C]glucosyl phosphate and 14 C-labeled lipid-linked oligosaccharides from UDP-D- 14 C]glucose[J]. Journal of Biological Chemistry, 1977, 252(7): 2271-2277.
- [15] PALAMARCZYK G, DRAKE R, HALEY B, LENNARZ WJ. Evidence that the synthesis of glucosylphosphodolichol in yeast involves a 35-kDa membrane protein[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,

- 1990, 87(7): 2666-2670.
- [16] JANKOWSKI W, CHOJNACKI T. Formation of lipid-linked sugars in rat liver and brain microsomes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1972, 260(1): 93-97.
- [17] WEDGWOOD JF, STROMINGER JL, WARREN CD. Transfer of sugars from nucleoside diphosphosugar compounds to endogenous and synthetic dolichyl phosphate in human lymphocytes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1974, 249(19): 6316-6324.
- [18] HEESEN S, LEHLE L, WEISSMANN A, AEBI M. Isolation of the *alg5* locus encoding the UDP-glucose: dolichyl-phosphate glucosyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 224(1): 71-79.
- [19] GRABIŃSKA KA, GHOSH SK, GUAN ZQ, CUI JK, RAETZ CRH, ROBBINS PW, SAMUELSON J. Dolichyl-phosphate-glucose is used to make *O*-glycans on glycoproteins of *Trichomonas vaginalis*[J]. *Eukaryotic Cell*, 2008, 7(8): 1344-1351.
- [20] BLOCH JS, PESCIULLES G, BOILEVIN J, NOSOL K, IROBALIEVA RN, DARBRE T, AEBI M, KOSSIAKOFF AA, REYMOND JL, LOCHER KP. Structure and mechanism of the ER-based glucosyltransferase Alg6[J]. *Nature*, 2020, 579(7799): 443-447.
- [21] LI ST, LU TT, XU XX, DING Y, LI ZJ, KITAJIMA T, DEAN N, WANG N, GAO XD. Reconstitution of the lipid-linked oligosaccharide pathway for assembly of high-mannose *N*-glycans[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 1813.
- [22] CHEN KH, YANG JS, HWANG CY, FANG JM. Phospholipid-induced aggregation and anthracene excimer formation[J]. *Organic Letters*, 2008, 10(20): 4401-4404.
- [23] GUERNELLI S, LAGANÀ MF, MEZZINA E, FERRONI F, SIANI G, SPINELLI D. Supramolecular complex formation: a study of the interactions between β -cyclodextrin and some different classes of organic compounds by ESI-MS, surface tension measurements, and UV/vis and ^1H NMR spectroscopy[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2003, 2003(24): 4765-4776.
- [24] WU ZL, LI AY, FAN BH, XUE F, ADACHI C, OUYANG JY. Phenanthrene-functionalized 3,6-dithiophen-2-yl-2,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4-diones as donor molecules for solution-processed organic photovoltaic cells[J]. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 2011, 95(8): 2516-2523.
- [25] WILSON IB, WEBBERLEY MC, REVERS L, FLITSCH SL. Dolichol is not a necessary moiety for lipid-linked oligosaccharide substrates of the mannosyltransferases involved in *in vitro* *N*-linked-oligosaccharide assembly[J]. *The Biochemical Journal*, 1995, 310(Pt 3): 909-916.
- [26] 李盛陶, 王宁, 高晓冬. 植烷醇磷酸甘露糖的酶法合成及应用[J]. *食品与生物技术学报*, 2020, 39(3): 49-55.
- LI ST, WANG N, GAO XD. Enzymatic synthesis and application of phytanol-phosphate mannose[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2020, 39(3): 49-55 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)