

环糊精水解酶底物运输通道的动态结构分析*

Dynamic Structural Study on Substrate Transport Channels of Cyclodextrin Hydrolase

闭海¹,莫莉¹,郭媛²,林丽华^{1,2},黄日波^{1,2},庞浩^{1,2**}

BI Hai¹,MO Li¹,GUO Yuan²,LIN Li-hua^{1,2},HUANG Ri-bo^{1,2},PANG Hao^{1,2}

(1. 广西大学生命科学与技术学院,广西南宁 530004;2. 广西科学院,非粮生物质酶解国家重点实验室,国家非粮生物质能源工程技术研究中心,广西生物质产业化工程院,广西生物炼制重点实验室,广西南宁 530007)

(1. College of Life Science & Technology of Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China;2. Guangxi Academy of Sciences, State Key Laboratory of Non-Food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Biomass Industrialization Engineering Institute, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要:【目的】环糊精水解酶是作用于特殊底物的水解酶,可以水解圆锥形结构的底物。分析这个酶的底物通道为水解特殊结构底物提供研究基础。【方法】利用分子动力学模拟环糊精水解酶存在的底物通道,比较环糊精水解酶 BsCMD_1J0H 和 TspCMD_1SMA 在底物运输通道上的差异。【结果】BsCMD_1J0H 和 TspCMD_1SMA 都为糖基水解酶家族 13 的蛋白质,它们的碳骨架基本吻合,而在 α -螺旋分布上,TspCMD_1SMA 相比于 BsCMD_1J0H 来说,螺旋结构更趋向于在蛋白质中心聚集。BsCMD_1J0H 有 6 条底物通道连通蛋白质表面和活性中心,TspCMD_1SMA 有 8 条底物通道连通。BsCMD_1J0H 的底物通道平均半径为 1Å,TspCMD_1SMA 的底物通道平均半径为 1.2Å。【结论】本研究提供了 BsCMD_1J0H 和 TspCMD_1SMA 两个蛋白质在和底物接触中的相关底物通道信息。

关键词:环糊精水解酶 底物通道 3D 结构 底物运输 淀粉

中图分类号:Q556 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2014)01-0012-05

Abstract:【Objective】Cyclodextrin hydrolase contains a special function on substrate. It can hydrolyze cyclodextrin molecule with a conical structure. The analysis of the substrate channels of this enzyme would help the basic research on enzymatic hydrolysis of special substrate. 【Method】The analyses of substrate tunnels from cyclodextrin hydrolases, named BsCMD_1J0H and TspCMD_1SMA, were performed with the method of molecular dynamics simulation. 【Result】

These two proteins belong to glycosyl hydrolase family 13. In the structural alignment, both BsCMD_1J0H and TspCMD_1SMA showed a basic consistent of the carbon skeleton. However, the distribution of the α -helix of TspCMD_1SMA was tend to gathering at the center compared with BsCMD_1J0H. The analysis of substrate channels shows that there are six channels connected protein surface and the active center in BsCMD_1J0H, while eight channels in TspCMD_1SMA. The average radius of substrate tunnels are 1Å and 1.2Å for BsCMD_1J0H and TspCMD_1SMA, respectively. 【Con-

收稿日期:2013-08-13

修回日期:2013-11-04

作者简介:闭海(1976-),女,助理工程师,主要从事生物信息与酶学研究。

* 广西科技合作与交流计划项目(桂科合 1347004-1),广西科技攻关项目(桂科攻 10123007-3),广西科学院基本科研业务费项目(12YJ25SW05, 13YJ22SW),国家自然科学基金项目(21366007)资助。

** 通讯作者:庞浩(1975-),男,博士,副研究员,硕士生导师,主要从事分子酶学和酶工程研究。Tel:0771-2503987;E-mail:panghouse@126.com。

clusion】This study provided the substrate channels of BsCMD_1J0H and TspCMD_1SMA proteins.

Key words: cyclodextrin hydrolase, substrate channels, 3D structure, substrate transport, starch

【研究意义】环糊精(Cyclodextrin,简称CD)是以直链淀粉作为底物在环糊精葡萄糖基转移酶作用下生成的一系列环状低聚糖的总称,通常含有6~8个D-吡喃葡萄糖单元。含有6个、7个、8个葡萄糖单元的分子,分别称为 α 环糊精、 β 环糊精、 γ 环糊精。环糊精具有特殊的空间结构,它呈中间圆筒立体结构,内部疏水、外部亲水。其疏水空洞可以与有适当大小、形状及疏水性的分子非共价作用而形成稳定的包合物,从而改变被包合物的性质和反应性能^[1]。由于这个特殊的性质,在催化、分离、食品以及医药等领域中,环糊精受到了极大的重视和广泛应用。环糊精作为大分子客体的载体和稳定剂使用,可以使维生素、色素以及香料等在食品中稳定保存^[2]。在医药中,环糊精可以作为纳米级的药物载体,改善药物的溶解度和分散度,提高药物的药效^[3]。在化学工业中,环糊精可以用于手性化合物的分离,能够辨别位置异构体,提高化合物的分离和选择能力^[4]。由于环糊精的这些重要作用,针对环糊精的改性、合成以及水解的研究受到了重视。**【前人研究进展】**环糊精水解酶(EC 3.2.1.54)是一类具有水解环糊精能力的酶,该酶对环糊精、支链淀粉等大分子底物具有活性,且对环糊精的亲合性很高,而对淀粉等长链分子的亲和力弱^[5]。目前已经有学者对来自克氏芽孢杆菌(*Bacillus clarkii*)、黄杆菌(*Flavobacterium*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Geobacillus Stearothermophilus*)、浸麻类芽孢杆菌(*Paenibacillus macerans*)、普通嗜热放线菌(*Thermoactinomyces vulgaris*) R-47、栖热菌(*Thermus sp.*)IM6501等菌株的环糊精水解酶的蛋白质结构进行解析^[6]。同时对环糊精水解酶中和底物结合的相关氨基酸也进行了分析^[6,7]。但是还没有关于环糊精水解酶底物通道分析的报道。**【本研究切入点】**酶蛋白质的底物通道具有重要的作用。底物通道是指在酶蛋白质的三维结构中连通活性中心和蛋白质表面的孔洞,这个孔洞是用于底物进出酶的活性中心的^[8]。底物分子和底物通道的作用方式与酶分子的底物特异性密切相关,也与酶分子的催化效率有关,同时底物通道的微环境也与酶分子的最适pH值和作用温度有关^[9]。因而研究环糊精水解酶的底物通道可以提供蛋白质分子和底物的作用模式,为酶催化、酶改性环糊精提供研究基础。本研究利用分子动力学模拟环糊精水解酶存在的底物通道,比较了两种来源不同的环糊精水解酶在底物运输通道上的差异,为研究水解酶的底物特异性,以及环糊精水解酶和环状底物、小分子底物等不同底物的作用方式提供基础。

种来源不同的环糊精水解酶在底物运输通道上的差异,为研究水解酶的底物特异性,以及环糊精水解酶和环状底物、小分子底物等不同底物的作用方式提供基础。

1 方法

1.1 蛋白质氨基酸序列分析

使用jalview2.7软件进行序列分析。先从GenBank中下载蛋白质序列,再在jalview中利用clustwal进行比对,生成蛋白质比对图。BsCMD_1J0H为来自嗜热脂肪芽孢杆菌的环糊精水解酶(ID为P38940),TspCMD_1SMA为来自栖热菌IM6501的环糊精水解酶(ID为O69007)。

1.2 蛋白质结构比对分析

使用sybyl-1.1软件导入蛋白质结构数据,核对和校正后导出蛋白质单体结构到macpymol 1.5软件进行结构比对。比对结果用macpymol绘图并输出。

1.3 蛋白质结构通道分析

使用caver3软件进行分析,参数选择为java heap size 1100, minimum probe radius 0.9, shell depth 4, shell radius 3, clustering threshold 3.5。对于BsCMD_1J0H,起始点选择为23.321, -0.562, 47.289;对于TspCMD_1SMA,起始点选择为47.085, 36.255, 3.702。起始点参数: maximum distance 3Å, desired radius 5Å。

2 结果与分析

2.1 蛋白质序列比对结果

从比对结果(图1)可以发现,BsCMD_1J0H和TspCMD_1SMA蛋白质的序列差异很小,他们都为588个氨基酸组成的蛋白质,两者的相似性为86.39%。

2.2 蛋白质结构比对结果

从BsCMD_1J0H和TspCMD_1SMA蛋白质3D结构图(图2,a和b)可以看到,TspCMD_1SMA相比于BsCMD_1J0H来说螺旋结构更趋向于在蛋白质中心聚集,虽然在糖基水解酶家族13的蛋白质都呈现了(β/α)₈的3D蛋白质结构,但是在这两个蛋白质的贝塔折叠和阿拉法螺旋的位置呈现不同的排布。而蛋白质的骨架比较(图2c)中,两个蛋白质的骨架的基本走向基本吻合。

```

BsCMD_1J0H_A/1-588 1 HRKEA IYHRPA DNFAYAYDSETLHLRLR TKKDD IDRVELLHGDPYDHWQNGANQFQMHPMRKTGSGELFDY 70
TspCMD_1SMA_A/1-588 1 HRKEA HHRST DNFAYAYDSETLHLRLQTKKNVGHVELLFGDPYEHDGANQFQTMRMRKTGSGELFDY 70

BsCMD_1J0H_A/1-588 71 FFAEVKPPYRRLRYGFVLYSGE EKLVTYERGFYFVPT DDTAYYFCFPFLHRVDLFEAPDMVKDITVWYQI 140
TspCMD_1SMA_A/1-588 71 FLAEVKPPYRRLRYGFVLYRAG EKLVTYERGFYHFAAS DDTAYYFCFPFLHRVDLFEAPDMVKDITVWYQI 140

BsCMD_1J0H_A/1-588 141 FPERFANGNPS ISIEGSRFNGS EDPPTPTSF FGGDLQGIIDHLDYLV DLGITG IYLTPIFHS SFENHKYDTA 210
TspCMD_1SMA_A/1-588 141 FPERFANGNPA ISIEK SARFNGS EDPPTPTSF FGGDLQGIIDHLDYLA DLGITG IYLTPIFRA SFENHKYDTA 210

BsCMD_1J0H_A/1-588 211 DYFEVDPHFGDKETLKL IDRCHEKG IRVMLDAVFNHCGYEFAPFDVWV KNGESSKYKDFH IHEFPLQT 280
TspCMD_1SMA_A/1-588 211 DYFEIDPHFGDKETLKL VKRCHEKG IRVMLDAVFNHCGYEFAPFDV LKNGAASRYKDFH IREFPLQT 280

BsCMD_1J0H_A/1-588 281 EFRPNYDTFAFVQHPKLNANFEVKRYLLDVATYW IREFD IDGWRLDVANE IDHEFWREFROEVKALKP 350
TspCMD_1SMA_A/1-588 281 EFRPNYDTFAFVHHPELNTHFEVKRYLLDVATYW IREFD IDGWRLDVANE IDHQFWREFROAVKALKP 350

BsCMD_1J0H_A/1-588 351 DVYILGEIWHDAMPWLRGDDQFDVAVNYPFTDGVLRFFAKEEISARQFANQMHHVLSYFNNVNEAAFNLL 420
TspCMD_1SMA_A/1-588 351 DVYILGEIWHDAMPWLRGDDQFDVAVNYPFLADAA LRFFAKEDMSASEFADRLHHVLSYFKQVNEAAFNLL 420

BsCMD_1J0H_A/1-588 421 GSHDTSRILTVCGGD IIRKVKLLFLFQLTFTGSPCIYYGDEIGMTGGNDPECRKCHVWDIMQDNKELHQQEV 490
TspCMD_1SMA_A/1-588 421 GSHDTPRILTVCGGDVIRKVKLLFLFQLTFTGSPCIYYGDEIGMTGGNDPECRKCHVWDIEKDNKELYEV 490

BsCMD_1J0H_A/1-588 491 KQLIALRKQYRSLRRGEISFLHADDENMYL IYKKTGDDETVLVIINRS DQKADIPFLDARGTGLVNLTL 560
TspCMD_1SMA_A/1-588 491 KQLIALRKQYRALRRGDVAFLTADDEVHLLVYAKTDGNETVM IINRSNEAEIPFLDARGKGLVNLTL 560

BsCMD_1J0H_A/1-588 561 GERFAAEASTLCTSLPPYGFVLYAIEHW 588
TspCMD_1SMA_A/1-588 561 GERFAAEASTLCVSLPPYGFVLYAVESW 588

```

图1 蛋白质序列比对

Fig. 1 Protein sequences alignment

注:BsCMD_1J0H 为来自嗜热脂肪芽胞杆菌的环糊精水解酶(ID 为 P38940),TspCMD_1SMA 为来自栖热菌 IM6501 的环糊精水解酶(ID 为 O69007)。

Note:BsCMD_1J0H (ID:P38940) is a cyclodextrin hydrolase from *Geobacillus stearothermophilus*, TspCMD_1SMA (ID: O69007) is a cyclodextrin hydrolase from *Thermus* sp. IM6501.

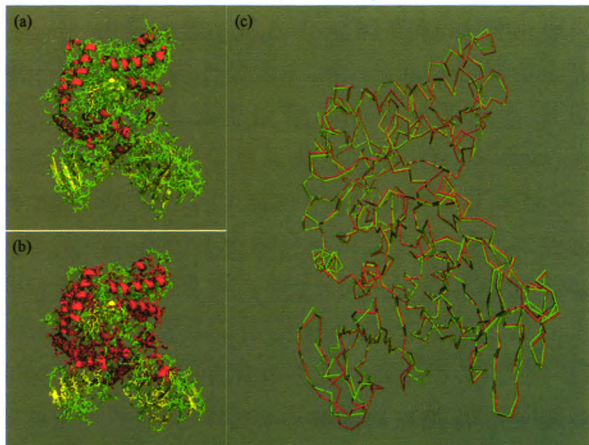


图2 蛋白质 3D 结构

Fig. 2 3D structures of proteins

(a) BsCMD_1J0H; (b) TspCMD_1SMA; (c) BsCMD_1J0H 和 TspCMD_1SMA 的结构比对示意图,红色为 BsCMD_1J0H,绿色为 TspCMD_1SMA。

(a)BsCMD_1J0H;(b)TspCMD_1SMA;(c)The structure alignment of BsCMD_1J0H and TspCMD_1SMA, BsCMD_1J0H is in red and TspCMD_1SMA in green.

2.3 蛋白质底物通道的位置及空间状态

图 3(a)给出了 BsCMD_1J0H 的底物通道存在的位置,共涉及 6 个通道,最长的由 75 个氨基酸组成,最短的由 16 个氨基酸组成。

图 3(b)给出了 TspCMD_1SMA 的底物通道的位置,共涉及 8 个通道,最长的有 48 个氨基酸,最短的有 23 个氨基酸。

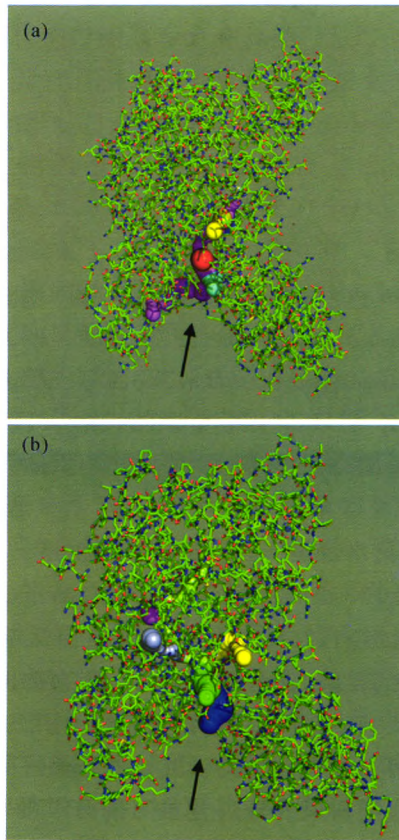


图3 BsCMD_1J0H(a)和 TspCMD_1SMA(b)的底物通道
Fig. 3 Substrate tunnels of BsCMD_1J0H(a) and TspCMD_1SMA(b)

注:箭头示意通道位置。

Note:Arrows show the position of tunnel.

BsCMD_1J0H 的底物通道平均半径都较小,最大的只为 1.11Å(表 1)。而 TspCMD_1SMA 的底物通道中,最大的半径为 1.53Å(表 2)。环糊精分子是呈圆锥形的空间结构的,平均大小为 16Å,这些底物通道都不适合环糊精的通过。这个解释了环糊精水解酶需要多聚体的形态才能维持对环糊精的水解能力,多聚体蛋白质形成组合的底物通道,容纳大体积的环糊精的通过。如果多聚体解聚,单体蛋白质的底物通道无法允许环糊精的通过,单体蛋白质丧失对环糊精的水解能力,只能水解小分子的寡糖。

表 1 BsCMD_1J0H 的底物通道空间状态

Table 1 Status of substrate tunnels of BsCMD_1J0H

编号 Number	平均半径 Average radius (Å)	最大半径 Maximum radius (Å)	长度 Length (Å)	平均曲率 Average curvature	优先级 Priority
1	1.11	1.12	8.15	1.24	0.66
2	1.11	1.12	6.61	1.29	0.66
3	1.11	1.12	22.27	1.29	0.47
4	1.11	1.12	29.88	1.38	0.40
5	0.90	0.90	21.85	1.34	0.33
6	0.90	0.91	65.43	2.02	0.06

表 2 TspCMD_1SMA 的底物通道空间状态

Table 2 Status of substrate tunnels of TspCMD_1SMA

编号 Number	平均半径 Average radius (Å)	最大半径 Maximum radius (Å)	长度 Length (Å)	平均曲率 Average curvature	优先级 Priority
1	1.53	1.53	15.51	1.30	0.73
2	1.53	1.53	12.49	1.26	0.70
3	1.53	1.53	12.08	1.21	0.67
4	1.32	1.33	15.88	1.39	0.54
5	0.93	0.94	21.10	1.81	0.39
6	0.94	0.95	28.61	1.53	0.30
7	0.95	0.96	25.42	1.50	0.26
8	0.94	0.95	37.51	1.71	0.16

3 讨论

底物通道是连接酶蛋白质分子活性中心和蛋白质表面的孔道,这个孔道是底物进入活性中心的通道。通过研究一个酶的底物通道,可以揭示这个酶和底物分子的作用方式、了解各种微环境对酶的水解活力、酶的底物特异性的影响。

通过利用分子动力学的方法分析酶分子的底物通道,这样的研究方法可以获得比晶体结构解析更多的信息。特别是当酶和底物发生诱导变构的情况时,酶分子识别底物从而打开结构的某一部分,使得底物

可以进入活性中心,这样的过程需要结合分子动力学对酶和底物的动态结合路径进行分析^[10]。底物通道的动态分析在细胞色素酶的研究中已经开展,这些工作表明,在细胞色素酶中底物结构的差异会导致活性中心和通道的相互作用改变,底物通道的选择倾向不同;由于酶对底物的选择性氧化,造成同一底物具有不同的进出通道;酶的动力学运动会导致通道的改变,因而通过晶体结构分析得到的孔洞并不一定适合底物运动^[10]。而在对卤代烷脱卤酶的研究中,卤代烷脱卤酶是一类特殊的对环状苯环具有特异性的酶,利用分子动力学方法对卤代烷脱卤酶的底物通道的分析以及分子改造工作获得了一系列突出的成果^[11]。在分析底物通道的基础上,对组成底物通道的氨基酸进行改造,获得了酶学性质改善的突变体^[12]、以及酶稳定性提高的突变体^[13]。

环糊精水解酶是一类具有特殊的水解圆锥形空间结构底物分子能力的酶^[14]。本研究分析了环糊精水解酶单体蛋白质中底物通道的位置分布以及底物通道的空间状态。结果表明,底物通道的直径明显小于环糊精的空间大小,显然是由于环糊精水解酶是以多聚体的形式出现的,多个亚基蛋白质组成更大的超分子可以提供更大的底物通道^[14]。在进一步的研究中扩大分析体系、引入蛋白质相互作用的分析,对多聚体蛋白质之间的底物运输通道底物运动方式进行分析可能可以解析环糊精底物进出活性中心的方式。这些研究将为对广西特色的生物质如蔗糖、木薯淀粉的水解酶研究提供研究基础^[15]。

4 结论

本研究模拟了环糊精水解酶和底物相互作用涉及到的底物通道,给出了通道的空间状态以及底物通过的优先顺序,这些涉及到底物接触的关键通道和相关氨基酸,为进一步进行分子改造工作提供了研究基础。

参考文献:

- [1] Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry[J]. Chem Rev, 1998, 98(5): 1743-1754.
- [2] Howard L R, Brownmiller C, Prior R L, et al. Improved stability of chokeberry juice anthocyanins by beta-cyclodextrin addition and refrigeration [J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(3): 693-699.
- [3] Kayaci F, Ertas Y, Uyar T. Enhanced thermal stability of eugenol by cyclodextrin inclusion complex encapsulated in electrospun polymeric nanofibers[J]. J Agric Food Chem, 2013, 61 (34): 8156-8165.

- [4] Sanchez-Hernandez L, Serra N S, Marina M L, et al. Enantiomeric separation of free L- and D-amino acids in hydrolyzed protein fertilizers by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(21):5022-5030.
- [5] Nakagawa Y, Saburi W, Takada M, et al. Gene cloning and enzymatic characteristics of a novel gamma-cyclodextrin - specific cyclodextrinase from alkalophilic *Bacillus clarkii* 7364 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1784(12):2004-2011.
- [6] Ferrer M, Beloqui A, Golyshina O V, et al. Biochemical and structural features of a novel cyclodextrinase from cow rumen metagenome [J]. *Biotechnol J*, 2007, 2(2):207-213.
- [7] Costa H, Distefano A J, Marino-Buslje C, et al. The residue 179 is involved in product specificity of the *Bacillus circulans* DF 9R cyclodextrin glycosyltransferase [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 94(1):123-130.
- [8] Teng Y B, Jiang Y L, He Y X, et al. Structural insights into the substrate tunnel of *Saccharomyces cerevisiae* carbonic anhydrase Nce103 [J]. *BMC Struct Biol*, 2009, 9:67.
- [9] Sikorski P, Sorbotten A, Horn S J, et al. *Serratia marcescens* chitinases with tunnel - shaped substrate - binding grooves show endo activity and different degrees of processivity during enzymatic hydrolysis of chitosan [J]. *Biochemistry*, 2006, 45(31):9566-9574.
- [10] 沈中华 李卫华, 许袖, 等. 细胞色素 P450 配体通道的研究进展 [J]. *科学通报*, 2011, 56(3):189-197.
Shen Z H, Li W H, Xu Y, et al. Advances in the ligand channels of cytochrome P450s (in Chinese) [J]. *Chinese Sci Bull (Chinese Ver)*, 2011, 56(3):189-197, doi: 10.1360/972010-1865.
- [11] Stepankova V, Khabiri M, Brezovsky J, et al. Expansion of access tunnels and active-site cavities influence activity of haloalkane dehalogenases in organic cosolvents [J]. *Chembiochem*, 2013, 14(7):890-897.
- [12] Biedermannova L, Prokop Z, Gora A, et al. A single mutation in a tunnel to the active site changes the mechanism and kinetics of product release in haloalkane dehalogenase LinB [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(34):29062-29074.
- [13] Koudelakova T, Chaloupkova R, Brezovsky J, et al. Engineering enzyme stability and resistance to an organic cosolvent by modification of residues in the access tunnel [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, 52(7):1959-1963.
- [14] Lee H S, Kim M S, Cho H S, et al. Cyclomaltodextrinase, neopullulanase, and maltogenic amylase are nearly indistinguishable from each other [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(24):21891-21897.
- [15] 杜丽琴, 杨键, 朱绮霞, 等. 酿酒酵母蔗糖酶基因的克隆、异源表达及重组酶学性质研究 [J]. *广西科学*, 2008, 15(2):184-188.
Du L Q, Yang J, Zhu Q X, et al. Cloning, expression and characterization of gene encoding invertase from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Guangxi Sciences*, 2008, 15(2):184-188.

(责任编辑:陈小玲)