

序列结构对酪氨酸酚裂解酶耐热性的贡献

李雪雯, 郑穗平*

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 为了解酪氨酸酚裂解酶(TPL)热稳定性与序列之间的关系, 为突变产生耐热性的酪氨酸酚裂解酶提供参考, 利用生物信息学对来源于 *Symbiobacterium toebii* 的耐热酪氨酸酚裂解酶 StTPL、来源于 *Fusobacterium nucleatum* 的耐热酪氨酸酚裂解酶 FnTPL 和来源于 *Citrobacter freundii* 的中温酪氨酸酚裂解酶 CfTPL 进行进化树、一级结构、二级结构和三级结构的比较。随着 TPL 中一级结构中脯氨酸含量增多, 最适反应温度的增加, StTPL、FnTPL 和 CfTPL 的脯氨酸含量分别为 5.02%、3.70%、2.85%, 二级结构中 β -折叠和转角较多, 分别为 25.51%、25.00%、23.91%, 这些特征符合文献报道的耐热酶和中温酶的区别。将 StTPL、FnTPL 和 CfTPL 的三维结构叠加对比发现, 310-313 残基区域、残基 13、82-88 残基区域叠加效果差, 313 残基突变有利于 CfTPL 提高热稳定性, StTPL 中的 Ala13、Glu83、Thr407 突变有利于 StTPL 热稳定性, 推测以上残基区域和热稳定性相关, 也符合已有文献报道的情况。此外, 有关生物信息学分析为进一步理解超稳酶的超稳机制以及筛选改造新的超稳酶提供了初步参考。

关键词: 酪氨酸酚裂解酶; 热稳定性; 生物信息学

文章编号: 1673-9078(2022)07-70-78

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.7.0858

Contribution of Sequence Structure to the Thermotolerance of Tyrosine Phenol Lyase

LI Xuewen, ZHENG Suiping*

(School of Biological Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In order to understand the relationship between the thermostability of tyrosine phenol lyase (TPL) and its sequence, and to provide a reference for mutating the tyrosine phenol lyase to produce thermotolerant tyrosine phenol lyase, bioinformatics was used to analyze the thermostable tyrosine phenollases, StTPL derived from *Symbiobacterium toebii*, FnTPL derived from *Fusobacterium nucleatum*, and mesophilic CfTPL derived from *Citrobacter freundii*. These lyases were compared in terms of phylogenetic tree, primary structure, secondary structure and tertiary structure. With the increase of the proline content in the primary structure of TPL, the optimal reaction temperature increased. The proline contents of StTPL, FnTPL and CfTPL were 5.02%, 3.70% and 2.85%, respectively. There were more β -sheets and turns in the secondary structure, which were 25.51%, 25.00%, and 23.91%, respectively. These characteristics were in line with the difference between thermostable enzymes and mesophilic enzymes reported in the literature. The comparison of the three-dimensional structures of StTPL, FnTPL and CfTPL revealed that the 310-313 residue region, residue 13, and 82-88 residue region had a poor superposition effect. The mutation of the 313 residue was conducive to the thermal stability of CfTPL. The mutation of Ala13, Glu83 and Thr407 residue was conducive to the thermal stability of StTPL. It is speculated that the above residue regions are related to thermal stability, which is also in line with the findings reported in the literature. In addition, the relevant bioinformatics analysis provides a preliminary reference for further understanding the hyperstability mechanism of hyperstable enzymes and screening and transforming new hyperstable enzymes.

Key words: tyrosine phenol lyase; thermal stability; bioinformatics

引文格式:

李雪雯, 郑穗平. 序列结构对酪氨酸酚裂解酶耐热性的贡献[J]. 现代食品科技, 2022, 38(7): 70-78

LI Xuewen, ZHENG Suiping. Contribution of sequence structure to the thermotolerance of tyrosine phenol lyase [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(7): 70-78

收稿日期: 2021-08-05

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFA0901700)

作者简介: 李雪雯(1994-), 女, 硕士生, 研究方向: 数据库构建, E-mail: lixuewen1210@163.com

通讯作者: 郑穗平(1972-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 发酵工程, 生物化工, 微生物学, 生化与分子生物学, E-mail: spzheng@scut.edu.cn

酪氨酸酚裂解酶在高温下保持良好活性对 L-酪氨酸的生产有着重要意义。L-酪氨酸是人和动物生长发育及新陈代谢中起着重要作用的芳香族氨基酸,在食品、化工和医药行业中有着重要的应用^[1],可以作为食品添加剂、人工饲料使用,L-酪氨酸是 L-多巴、黑色素和沙弗拉霉素 A 的前体物质,其中 L-多巴用于治疗帕金森病,黑色素有着抗氧化的作用,可以用于化妆和医药领域,而沙弗拉霉素 A 具有抗肿瘤和抗菌活性的天然产物^[2]。在生产上可以用丙酮酸作为原料,通过酪氨酸酚裂解酶催化生产 L-酪氨酸。酪氨酸酚裂解酶(TPL, EC4.1.99.2)也称为 β -酪氨酸酶,是依赖于磷酸吡哆醛(PLP)的多功能酶,可以将苯酚、丙酮酸和氨转化成 L-酪氨酸^[3]。TPL 是一个由两个大小相同的催化二聚体构成的四聚体,每个二聚体由两个相同的小亚基组成,小亚基中包括了磷酸吡哆醛结合域(PLP)、N 末端臂和小结构域^[2]。TPL 来源广泛,其中微生物来源的有嗜热共生菌(*Symbiobacterium toebii*)^[4]、嗜热共生杆菌(*Symbiobacterium thermophilum*)、弗氏柠檬梭菌(*Citrobacter freundii*)、具核酸杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)、破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、草生欧文氏菌(*Erwinia Herbicola*)^[5]等。

TPL 的最适反应 pH 在 7~9 之间,属于中性酶,其反应 pH 范围在 6~11 之间,反应 pH 宽度较大;最适反应温度在 60~80 °C 之间,属于耐高温的酶,反应温度区间大,在 20~90 °C 内均能反应^[6-10]。在非细胞合成体系生产上,可以利用葡萄糖四步合成丙酮酸^[11],再由丙酮酸通过 TPL 催化生成 L-酪氨酸。由于合成丙酮酸的酶均在高温下反应,能在高温条件下保持良好稳定性的 TPL,对高效合成 L-酪氨酸有重要意义。选取来源于 *Symbiobacterium toebii* 的耐热酪氨酸酚裂解酶 StTPL、来源于 *Fusobacterium nucleatum* 的耐热酪氨酸酚裂解酶 FnTPL 和来源于 *Citrobacter freundii* 的中温酪氨酸酚裂解酶 CfTPL 开展相关生物信息学分析工作,对 TPL 热稳定性和序列之间的关系进行初步探究,为通过蛋白质工程提高酪氨酸酚裂解酶热稳定性提供关键位点的参考。

1 实验方法

1.1 建立进化树分析

从 Brenda 下载已有记录的酶的数据,使用 ClustalW 进行多序列比对,再使用 Mega 软件对比对结果建立进化树分析。

1.2 一级结构分析

利用 Ex PAsy 蛋白质一级结构分析工具 ProtParam,分析 TPL 的氨基酸组成、分子量、等电点等信息^[12],并用 BlastP 把需要比对的序列进行多序列比对。

1.3 疏水性、极性分析和跨膜结构域预测

利用 ExPAsy 疏水性和极性分析工具 ProtScale,计算分析蛋白质的疏水性和极性。采用了 ProtScale 网站中的 Hphob./Kyte & Doolittle 工具计算 TPL 的疏水性分布。通过 ProtScale 网站中的 Polarity/Grantham 计算 TPL 的极性分布。采用 TMHMM 网站分析 TPL 的跨膜结构域。

1.4 二级结构预测

二级结构预测采用蛋白质二级结构预测网站 prabi 来预测。

1.5 同源建模预测三级结构

同源建模是常用的预测蛋白质三维结构方法。根据序列同源性可以分成不同的蛋白质家族。如果一个蛋白质序列和另一个蛋白质序列具有大于 30% 的同源性,那么这两个蛋白质可能由同一祖先进化而来,称为同源蛋白质。同源蛋白质具有相似的结构和功能。利用结构已知的同源蛋白质作为模板,建立目标蛋白质的结构模型,然后用理论计算方法进行优化,达到预测目标蛋白质结构的目的。首先在 SWISS-MODEL 上搜索结构已知的与 TPL 的相似的序列,接着通过 SWISS-MODEL 的自动蛋白质同源建模服务器构建 TPL 的模型,再使用拉氏图进行模型评估。

1.6 模型比对

使用 MUSCLE 工具对 StTPL、FnTPL 和 CfTPL 进行多序列比对、使用 PDBFold 对建立好的三个模型进行结构比对。使用 Pymol 标记 StTPL、FnTPL 和 CfTPL 三个模型中的脯氨酸在二级结构的位置。

2 结果与讨论

2.1 TPL 多序列比较的进化树结果

StTPL 最适反应温度为 80 °C^[4],FnTPL 最适反应温度为 60 °C^[13],CfTPL 最适反应温度为 45 °C^[14]。从图 1 中看出 StTPL (Q0889) 和另一株耐热菌的酶(O0850)亲缘关系最近,而 CfTPL 则和 StTPL 亲缘关系较远,与 FnTPL 亲缘关系较近。

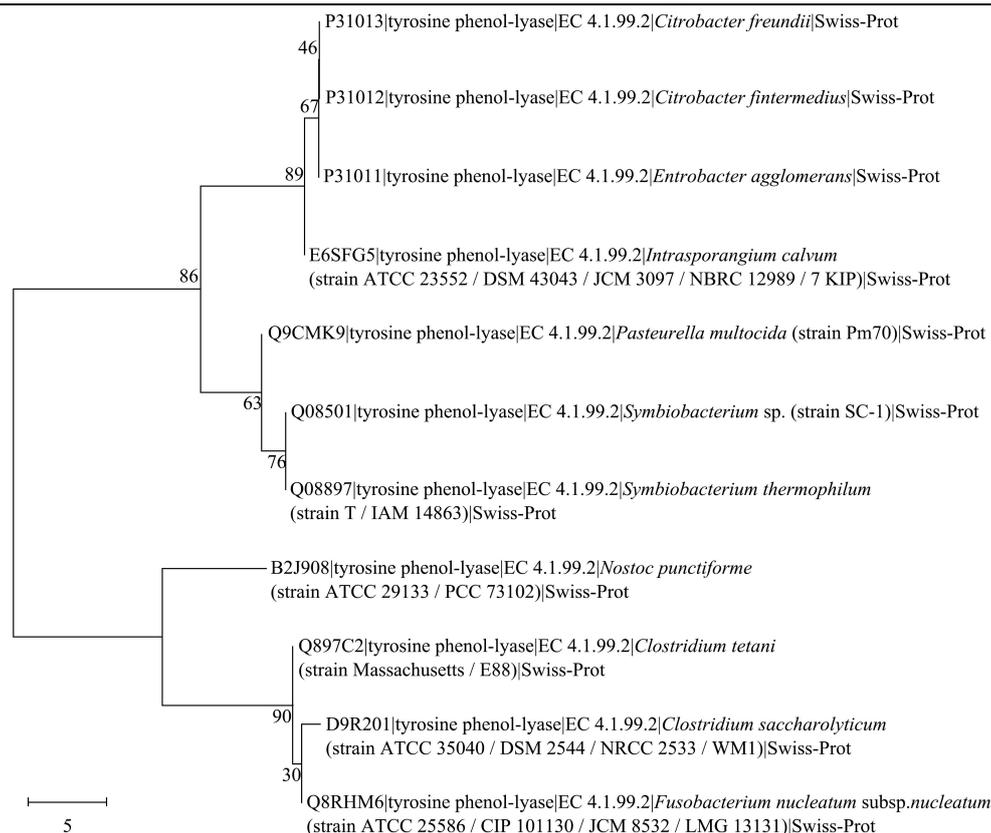


图 1 TPL 进化树结果图

Fig.1 TPL evolutionary tree result graph

表 1 StTPL、FnTPL 和 CfTPL 氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of StTPL, FnTPL and CfTPL

氨基酸	StTPL 数量	StTPL 的 Mol%	FnTPL 数量	FnTPL 的 Mol%	CfTPL 数量	CfTPL 的 Mol%
Ala	41	8.95	35	7.61	41	8.99
Arg	38	8.30	25	5.43	26	5.70
Asn	13	2.84	16	3.48	18	3.95
Asp	27	5.90	24	5.22	25	5.48
Cys	3	0.66	7	1.52	6	1.32
Gln	19	4.15	15	3.26	17	3.73
Glu	34	7.42	41	8.91	36	7.89
Gly	36	7.86	38	8.27	37	8.11
His	13	2.83	13	2.83	14	3.07
Ile	34	7.42	35	7.61	29	6.36
Leu	30	6.55	30	6.52	32	7.02
Lys	18	3.93	37	8.04	27	5.92
Met	19	4.14	15	3.26	20	4.39
Phe	18	3.93	22	4.78	21	4.61
Pro	23	5.02	17	3.70	13	2.85
Ser	13	2.83	12	2.61	18	3.95
Thr	19	4.15	21	4.57	20	4.39
Trp	5	1.09	1	0.22	1	0.22
Tyr	22	4.80	22	4.78	23	5.04
Val	33	7.21	34	7.39	32	7.02

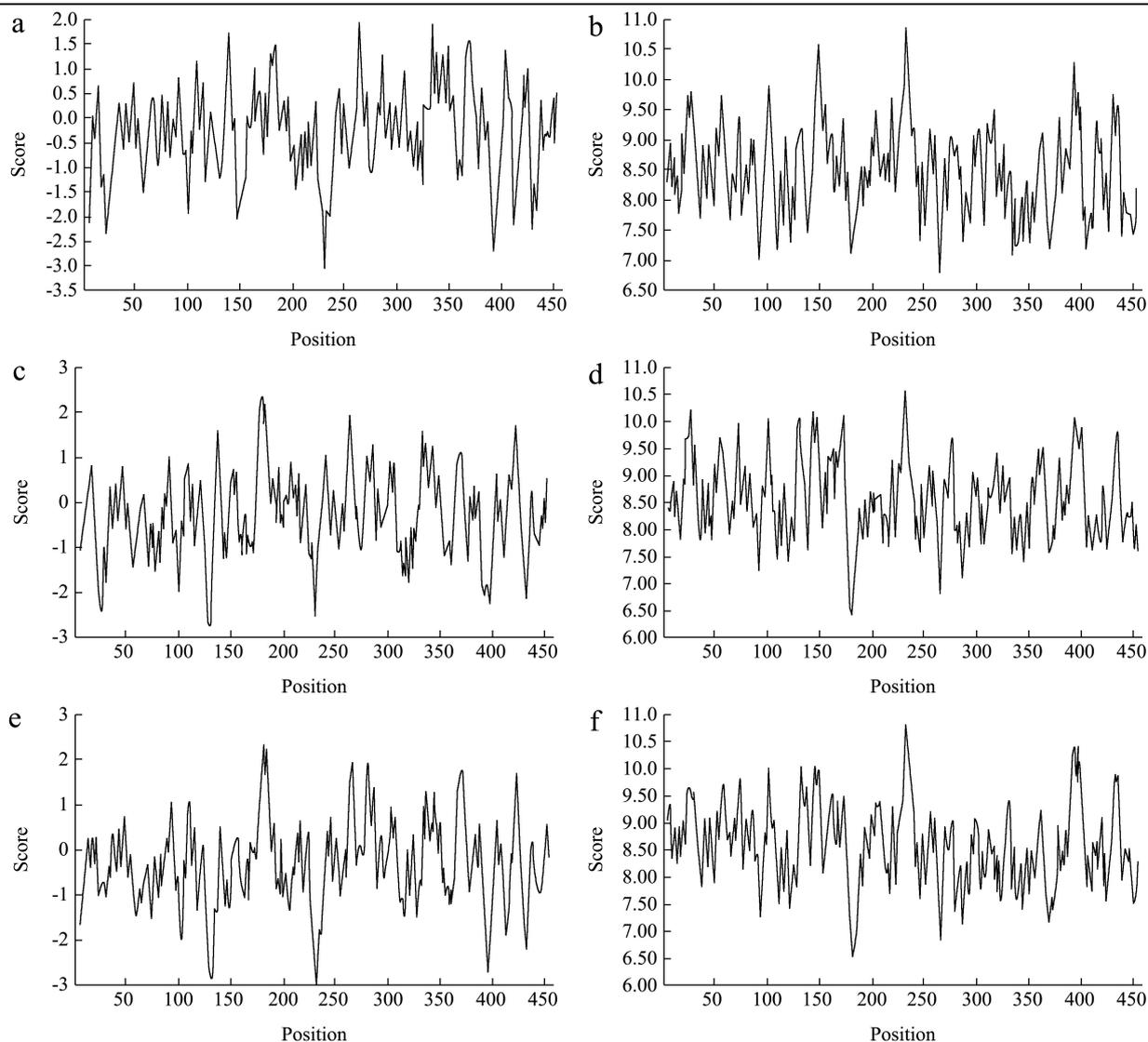


图2 疏水性分析和极性分布

Fig.2 Hydrophobicity analysis and polarity distribution

注: a、c、e 分别为 StTPL、FnTPL、CfTPL 的疏水性分析, b、d、f 分别为 StTPL、FnTPL、CfTPL 的极性分布。

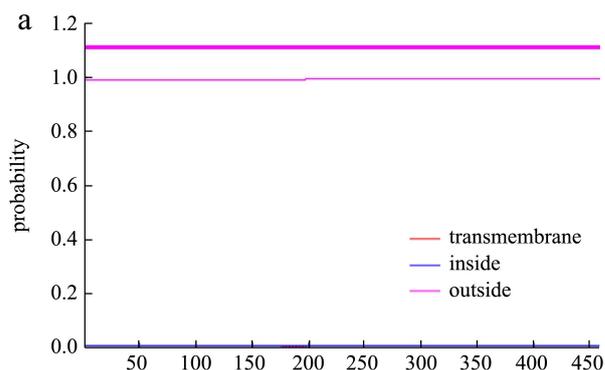
2.2 StTPL、FnTPL 和 CfTPL 生物信息学分析

结果

利用 ExPASy 数据库的蛋白质一级结构分析工具 ProtParam 分析得到 StTPL 的分子量为 52198.83 u、由 458 个氨基酸组成、等电点 (pI) 为 6.26, 其中带负电荷的氨基酸 (Asp+Glu) 数量为 61 个, 带正电荷的氨基酸 (Arg+Lys) 为 54 个; FnTPL 的分子量为 52156.02 u、由 460 个氨基酸组成、等电点 (pI) 为 6.53, 其中带负电荷的氨基酸 (Asp+Glu) 数量为 65 个, 带正电荷的氨基酸 (Arg+Lys) 为 52 个; CfTPL 的分子量为 51441.83 u、由 456 个氨基酸组成、等电点 (pI) 为 6.00, 其中带负电荷的氨基酸 (Asp+Glu) 数量为 61 个, 带正电荷的氨基酸 (Arg+Lys) 为 53 个。StTPL、FnTPL

和 CfTPL 氨基酸组成成分如表格 1 所示。

StTPL、FnTPL 和 CfTPL 的疏水性和极性分布结果如图 2 所示, 结果显示 StTPL、FnTPL 和 CfTPL 中并没有显著的疏水性或极性区域。TMHMM 预测的 StTPL、FnTPL 和 CfTPL 跨膜区域如图 3 所示, 结果显示 StTPL、FnTPL 和 CfTPL 没有跨膜区域。



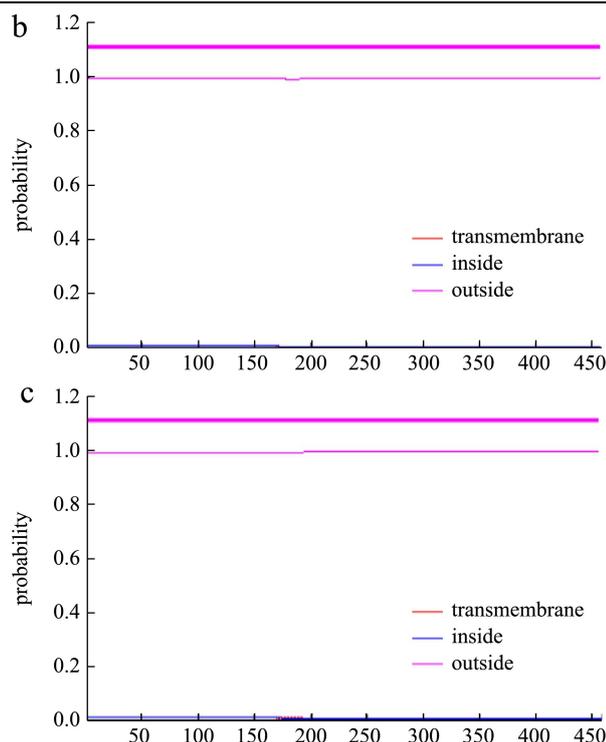


图3 跨膜区域分析

Fig.3 Transmembrane area analysis

注：a、b、c 分别为 StTPL、FnTPL、CfTPL 的跨膜区域分析。

StTPL、FnTPL 和 CfTPL 的二级结构预测结果如图 4。StTPL 的各种二级结构 Helix (H)、 β -Sheet (E)、Turn (T) 和 Coil (C) 的比例为：40.39%、16.81%、8.30%和 34.50%；FnTPL 的各种二级结构 Helix (H)、 β -Sheet (E)、Turn (T) 和 Coil (C) 的比例为：41.30%、16.74%、8.26%和 33.70%；CfTPL 的各种二级结构 Helix (H)、 β -Sheet (E)、Turn (T) 和 Coil (C) 的比例为：42.98%、16.23%，7.68%和 33.11%。与 CfTPL 相比，StTPL 和 FnTPL 的螺旋百分比减少， β -折叠和转角的百分比增加，增加的 β -折叠和转角二级结构在蛋白质的构象稳定性中起重要作用^[15]。

使用 SWISS-MODE 搜索模板对 StTPL、FnTPL 和 CfTPL 同源建模，结果显示 PDB ID 为 6mls 的蛋白适合作为模板，6mls 与 StTPL 的相似性为 62.94%，与 FnTPL 相似性为 81.84%，与 CfTPL 的相似性为 62.72%，均大于 30%，适合用当模板进行同源建模。图 5 为 StTPL、FnTPL 和 CfTPL 建模后的结构和模型的拉氏图评价。

GMQE 接近 1，QMEAN 接近 0，说明模型质量较好。理想情况下拉氏图评估中 Ramachandran Favoured 区域 >98%，Ramachandran Qutliers 区域

<0.20%，Rotamer Outliers 区域 <1.00%。由此看出两个模型效果良好，若要进行突变或结构分析，需进行进一步的优化。

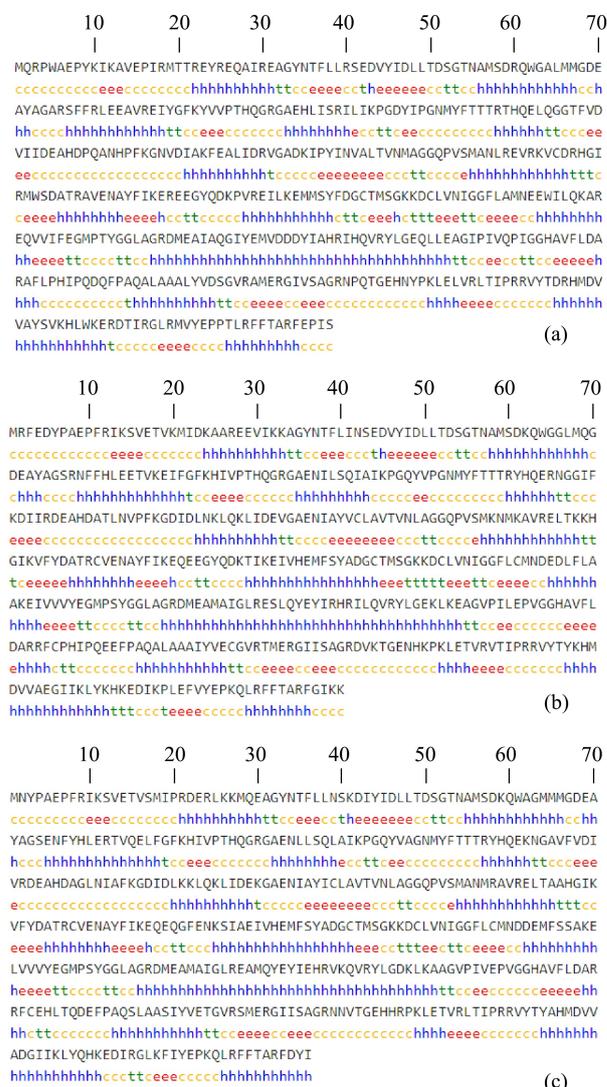
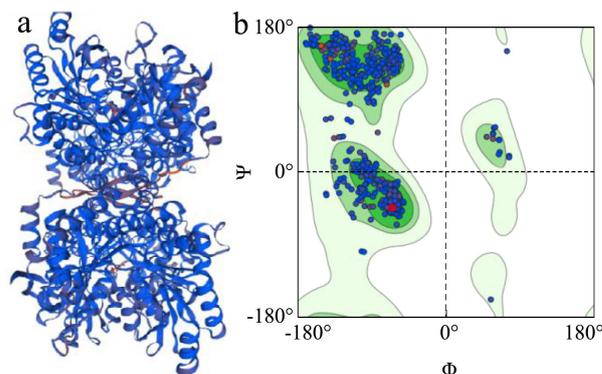


图4 二级结构预测结果

Fig.4 Secondary structure prediction result

注：a、b、c 分别为 StTPL、FnTPL、CfTPL 的二级结构预测结果。



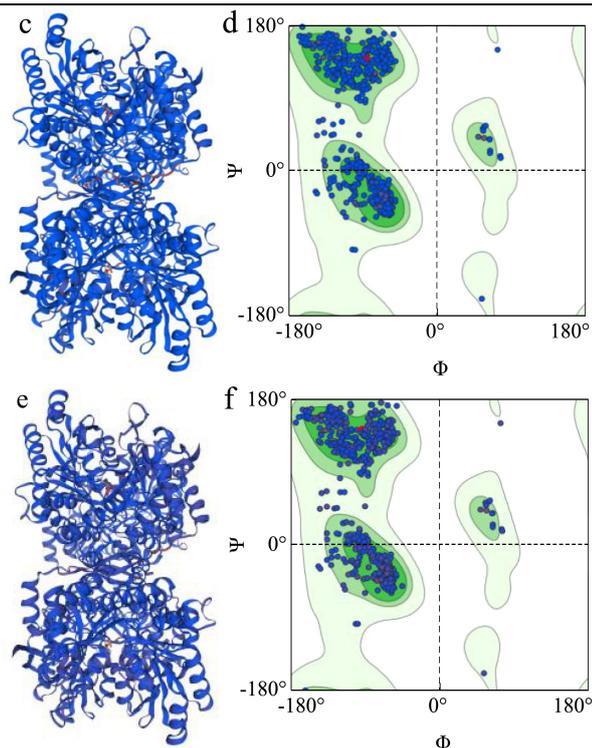


图5 三维结构和拉氏图评价

Fig.5 Three-dimensional structure and ramachandran diagram evaluation

注: a、c、e 分别为 StTPL、CfTPL、FnTPL 的三维结构, b、d、f 分别为 StTPL、CfTPL、FnTPL 的拉氏图评价。

表2 StTPL、FnTPL 和 CfTPL 模型评估

Table 2 Model evaluation of StTPL, FnTPL and CfTPL

	StTPL	FnTPL	CfTPL
GMQE 得分	0.88	0.93	0.97
QMEAN 得分	0.41	0.28	0.28
Ramachandran Favoured 区域/%	97.57	97.90	98.12
Ramachandran Outliers 区域/%	0.22	0.22	0.11
Rotamer Outliers 区域/%	0.79	0.92	1.06

2.3 StTPL、FnTPL 与 CfTPL 的生物信息学比较

把中温酶 CfTPL 和耐热酶 FnTPL、StTPL 进行多序列比对, 结果如图 6 所示; 序列比对结果和结构比对 RMSD 结果如图 7 所示。

根据 Vieillec 等^[16]的研究, 嗜热酶和嗜温酶具有许多共同点: (1)序列有 40%~85%相似性; (2)立体结构的可迭合性 (superposable); (3)相同的催化机制, 并且嗜热酶都能在嗜温菌中表达而性质不变, 说明热稳定性是其内在本质。三个来源不同的 TPL 序列相似度在 60%~85%, 符合序列相似度的共同点; RMSD 是测量某部分特定原子相对于一参考结构的坐标偏差,

最完美的重合时则 RMSD 为 0.0, 结果显示两两比对的的结果接近 0, 模型大部分能重合。

同源性较高的蛋白质却有着天壤之别的性质, 是由于某些关键氨基酸残基的差异造成的。脯氨酸残基在蛋白质结构以及热稳定性中具有特殊作用, 它十分偏爱 β 转折或无规卷曲结构, 而很少出现在 α 螺旋和 β 折叠中, 脯氨酸比其它氨基酸更适合位于 β 转折的第二位点或无规卷曲的拐角处, 它能使肽链更容易与其他专辑氨基酸的极性侧链形成氢键, 降低肽链骨架的柔性从而使结构更稳定, 且脯氨酸疏水侧链与邻近洞穴相互作用, 使得疏水基团包裹的 β 转折和无规卷曲各种键合更牢固, 增强稳定性, 因此在 β 转折中的脯氨酸能改善热稳定性^[17]。使用 Pymol 绘制蛋白结构并标记 CfTPL、FnTPL 和 StTPL 中所有脯氨酸的位置发现, 大部分的脯氨酸位于无规卷曲的拐角处, 而 CfTPL 有一个脯氨酸 Pro95 位于 β 转折中, FnTPL 中有两个脯氨酸位于 β 转折中, 分别是 Ppro96 和 Pro121, 在 StTPL 中位于 β 转折中的脯氨酸多达 4 个, 分别是 Pro16、Pro96、Pro119 和 Pro456。通过 Suzuki 等比较了 5 种 1,6-寡葡萄糖苷酶的序列发现当酶的热稳定性呈线性升高时, 它们序列中脯氨酸含量呈线性增长, 结果结构中的 α -螺旋含量下降, β -折叠和回折结构的含量几乎不变, 但参与疏水作用的氨基酸数量增加, 加强了酶的疏水核心作用。从一级结构比对看出, CfTPL 的脯氨酸摩尔百分比为 2.85%, FnTPL 的脯氨酸摩尔百分比为 3.70%, StTPL 的脯氨酸摩尔百分比为 5.02%, 随着最适反应的升高, 脯氨酸含量升高, StTPL 的脯氨酸摩尔百分比比较高, 与已报道的文献符合。从二级结构比对看, 与 CfTPL 相比, FnTPL 和 StTPL 的螺旋百分比减少, β -折叠和转角的百分比增多, 而增加的 β -折叠和转角二级结构在蛋白质的构象稳定性中起重要作用。以上数据能印证耐热酶 StTPL、FnTPL 和中温酶 CfTPL 在序列中的差异导致热稳定性有所不同。

把 StTPL、FnTPL、CfTPL 的模型叠加比对, 根据 Han 等^[11]的研究, 对 CfTPL 的 Glu313 位点进行突变, 把 Glu313 突变成 Trp313 和 Met313 后热稳定性提高, CfTPL, E313W 和 E313M 的熔融温度分别为 59.2、63.0、65.9 °C。如图 8 所示, 红色区域表示残基相同且匹配, 绿色区域表示残基不相同但匹配, 灰色区域表示不匹配, 三个 TPL 中的 309-313 残基区域并不能很好重叠, 而在 309-313 前后的区域, 两者均能很好重叠, 这个现象可能也进一步说明 310-313 区域和 TPL 的热稳定性有关系, 也与已报道的文献结果相符。

MUSCLE (3.8) multiple sequence alignment

TPL | Symbiobacterium_toebii ---MQRFWAEPYKIKAVEPIRMTTRRYREQAIREAGYNTFLLRSEBDVYIDLTDSGTNAM

TPL | Citrobacter_freundii ---MNYF-AEPPRIKSVETVSMIPRDEBLKKMQEAGYNTFLNSKDIYIDLTDSGTNAM

Fn-TPL | Fusobacteriu_nucleatum MRFEDYP-AEPPRIKSVETVEMIDKAAAREEVIKKAGYNTFLINSEBDVYIDLTDSGTNAM

: * **:. **:**. * . * : . :*****. *:*****

TPL | Symbiobacterium_toebii SDRQVQALMMGDEAYAGARSFFRLEAVREIYGFKYVVPVTHQGRGAEHLISRILIKPGDY

TPL | Citrobacter_freundii SDKQWAGMMMGDEAYAGSENFYHLERTVQELFGFKHIVPETHQGRGAENLLSQLAIKPGQY

Fn-TPL | Fusobacterium-nuleatum SDKQVGLMQGDEAYAGSRNFHLERTVKEIFGFKHIVPETHQGRGAENILSQAIKPGQY

..*.* ***. :*. * * :*. * :*****. :*. * :*****

TPL | Symbiobacterium_toebii IPGNMYFTTTRTHQELQGGTFVDVIIDEAHDPAQHPPKGNVDIAKFEALIDRVGADKIP

TPL | Citrobacter_freundii VAGNMYFTTTRYHQEKNGAVFVDIVRDEADAGLNIAFKGDIDLKQLKIDKGAENIA

Fn-TPL | Fusobacterium-nuleatum VPGNMYFTTTRYHQERNGGIFKDIIRDEAHDATLNVPPKGDIDLKQLKIDKGAENIA

:.***** ** * :*. * * :. *****. * .*****: * : * * * * :*.

TPL | Symbiobacterium_toebii YINVALTVNAGGQFVSMANLREVRKVCDRHGIRKWSDATRAVENAYFIKEREGYQDKP

TPL | Citrobacter_freundii YICLAVTVNLAGGQFVSMANRAVRELTAAHGKVFYDATRCVENAYFIKEQEQQFENKS

Fn-TPL | Fusobacterium-nuleatum YVCLAVTVNLAGGQFVSMENKAVRELTAKKHGKVFYDATRCVENAYFIKEQEYQDKT

* :.***** ***** * :. * * :. * * * :. *****. * :. * * * * :*.

TPL | Symbiobacterium_toebii VRBILKEMSYFDGCTMSCKKDLVNI GGFLAMNEEVLQKAREQVVFEGMPTYGGLAG

TPL | Citrobacter_freundii IAEIVHEMF SYADGCTMSCKKDLVNI GGFLCMNDEMFSSAKELVVVYEGMPSYGLAG

Fn-TPL | Fusobacterium-nuleatum IKEIVHEMF SYADGCTMSCKKDLVNI GGFLCMNDEDLFLAAKEIVVVYEGMPSYGLAG

: * :.***** ***** ***** * :. * * * :. * * * :. *****. * :. * * * * :*.

TPL | Symbiobacterium_toebii RDMEATAQGIYEMVDDYIAHRIHQVRYLGEQLLEAGPIVQPIGHAFLDARAFPHI

TPL | Citrobacter_freundii RDMEAMAIGLREAMQYIEYIHRVKQVRYLGDKLAAGVPIEPVGGHAVFLDARFCEHL

Fn-TPL | Fusobacterium-nuleatum RDMEAMAIGLRESLQYIYIHRILQVRYLGEKLEAGVPIEPVGGHAVFLDARFCEPHI

***** * : * :. * * * :. *****. * * :. * * * :. *****. * * :. * * * * :*.

TPL | Symbiobacterium_toebii PQDQFPAQALAAALYVDSGVRAMERGI VSAGRNPQTGEHNPKELELVRLTIPRRVYTDH

TPL | Citrobacter_freundii TQDEFFPAQSLAASIYVETGVRSMERGI ISAGRNNVTGEHHRKLETVRLTIPRRVYTYAH

Fn-TPL | Fusobacterium-nuleatum PQEFPFAQALAAAIYVECGVRTMERGI ISAGRDVKTGENHKPLETVRVTIIPRRVYTYKH

. :.***** ***** ***** ***** * :. * * * :. *****. * * :. * * * * :*.

TPL | Symbiobacterium_toebii MDVVAYSVKHLWKERDITIRGLRMVYEPPTLRFFTFARFEPIS

TPL | Citrobacter_freundii MDVVADGIIKLYQHKBDIRGLKFIYEPKQLRFFTFARFDYI-

Fn-TPL | Fusobacterium-nuleatum MDVVAEGIIKLYKHKBDIEKLEFVYEPKQLRFFTFARFGIKK

***** . :. * :. * * :. * * * :. *****

图 6 StTPL、FnTPL和CfTPL的多序列比对结果图

Fig.6 Result of multi comparison between StTPL, FnTPL and CfTPL

a Sequence Identity				b Cross-structure statistics.			
				RMSD			
structure:	1	2	3	structure:	1	2	3
1 StTPL.PDB:A,B,C,D		0.631	0.662	1 StTPL.PDB:A,B,C,D		0.068	0.062
2 CfTPL.pdb:A,B,C,D	0.631		0.813	2 CfTPL.pdb:A,B,C,D	0.668		0.041
3 FnTPL.pdb:A,B,C,D	0.662	0.813		3 FnTPL.pdb:A,B,C,D	0.062	0.041	

图 7 StTPL、FnTPL 和 CfTPL 的序列比对结果和结构比对 RMSD 结果

Fig.7 Sequence alignment results and structure alignment RMSD results of StTPL, FnTPL and CfTPL

H	B:GLU 308		H	B:GLU 309		H	B:GLU 311
H	B:ALA 309		H	B:MET 310		H	B:SER 312
H	B:MET 310			B:VAL 311		H	B:LEU 313
H	B:GLN 311		H	B:ASP 312		H	B:GLU 314
H	B:TYR 312		H	B:ASP 313		H	B:TYR 315
H	B:GLU 313		H	B:ASP 314		H	B:GLU 316
H	B:TYR 314		H	B:TYR 315		H	B:TYR 317
H	B:ILE 315		H	B:ILE 316		H	B:ILE 318
CfTPL			StTPL			FnTPL	

图 8 CfTPL、StTPL 和 FnTPL 的残基区域 310-313 结构对比图

Fig.8 Residue region of 310-313 CfTPL, FnTPL and StTPL structure comparison chart

a

S	A:ILE 10		S	A:ILE 11		S	A:ILE 13
S	A:LYS 11		S	A:LYS 12		S	A:LYS 14
S	A:SER 12		S	A:ALA 13		S	A:SER 15
S	A:VAL 13		S	A:VAL 14		S	A:VAL 16
S	A:GLU 14		S	A:GLU 15		S	A:GLU 17
CfTPL			StTPL			FnTPL	

b

H	A:LEU 80		H	A:LEU 81		H	A:LEU 83
H	A:GLU 81		H	A:GLU 82		H	A:GLU 84
H	A:ARG 82		H	A:GLU 83		H	A:GLU 85
H	A:THR 83		H	A:ALA 84		H	A:THR 86
H	A:VAL 84		H	A:VAL 85		H	A:VAL 87
H	A:GLN 85		H	A:ARG 86		H	A:LYS 88
H	A:GLU 86		H	A:GLU 87		H	A:GLU 89
H	A:LEU 87		H	A:ILE 88		H	A:ILE 90
H	A:PHE 88		H	A:TYR 89		H	A:PHE 91
H	A:GLY 89		H	A:GLY 90		H	A:GLY 92
CfTPL			StTPL			FnTPL	

图 9 a: CfTPL、StTPL 和 FnTPL 的残基 13 结构对比图; b: CfTPL、StTPL 和 FnTPL 的残基 83 附近区域结构对比图

Fig.9 a: Residue 13 of CfTPL, FnTPL and StTPL structure comparison chart; b: The area around residue 83 of CfTPL, StTPL and FnTPL structure comparison chart

根据 Rha 等^[18]的研究, StTPL 中 Ala13、Glu83 和 Thr407 突变为 Val13、Lys83、Ala407 后热稳定性

提高。如图 9 所示比对该残基附近的区域发现, 与 StTPL 的 Ala13 相对应的残基是 CfTPL 中的 Ser12 和 FnTPL 中的 Ser15, 在结构上并不能很好重合; 而 StTPL 中的 Glu83 附近的区域残基 83~89, 与 CfTPL 的残基 82~88、FnTPL 的残基 85~91 相对应, 而这部分区域差异较大。如图 10 所示, 与 StTPL 的残基 407 对应的 CfTPL 残基 406 和 FnTPL 残基 409 能很好重合, 且附近区域能重合的残基较多, StTPL 的 Thr407 突变为 Ala407 后热稳定性提高, 如果对 CfTPL 和 FnTPL 做定点突变提高热稳定性, 可以选择这个区域的位点进行突变尝试。

	D:PRO 398			D:PRO 399			D:PRO 401
	D:LYS 399			D:LYS 400			D:LYS 402
	D:LEU 400			D:LEU 401			D:LEU 403
	D:GLU 401			D:GLU 402			D:GLU 404
S	D:THR 402		S	D:LEU 403		S	D:THR 405
S	D:VAL 403		S	D:VAL 404		S	D:VAL 406
S	D:ARG 404		S	D:ARG 405		S	D:ARG 407
S	D:LEU 405		S	D:LEU 406		S	D:VAL 408
S	D:THR 406		S	D:THR 407		S	D:THR 409
	D:ILE 407			D:ILE 408			D:ILE 410
	D:PRO 408			D:PRO 409			D:PRO 411
	D:ARG 409			D:ARG 410			D:ARG 412
	D:ARG 410			D:ARG 411			D:ARG 413
CfTPL			StTPL			FnTPL	

图 10 CfTPL、StTPL 和 FnTPL 的残基 407 附近区域结构对比图

Fig.10 The area around residue 407 of CfTPL, StTPL and FnTPL structure comparison chart

3 结论

酪氨酸裂解酶选取了耐温酶 StTPL、FnTPL 和中温酶 CfTPL 进行比对, 结果显示 CfTPL 则和 StTPL 亲缘关系较远, 与 FnTPL 亲缘关系较近, 三者均无明显极性区、疏水区 and 跨膜区。从一级结构比对看出, 随着最适反应的升高, 脯氨酸含量升高, 最适反应温度为 45 °C 的 CfTPL 脯氨酸含量为 2.85%, 最适反应温度为 60 °C 的 FnTPL 脯氨酸含量为 3.70%, 最适反应温度为 80 °C 的 StTPL 脯氨酸含量为 5.02%, 而脯氨酸在蛋白质结构以及热稳定性中具有特殊作用, 与已报道的文献符合。从二级结构对比看, 与 CfTPL 相比,

FnTPL 和 StTPL 的螺旋结构百分比减少, β -折叠和转角的百分比增多, 分别为 23.91%、25.00%和 25.51%, 而增加的 β -折叠和转角二级结构在蛋白质的构象稳定性中起重要作用。以上数据能印证耐热酶 StTPL、FnTPL 和中温酶 CfTPL 在序列中的差异导致热稳定性有所不同。三个 TPL 的模型叠加比对结果显示, 310-313 残基区域、残基 13、82-88 残基区域叠加效果差, 313 残基突变有利于 CfTPL 提高热稳定性, StTPL 中的 Ala13、Glu83 突变有利于 StTPL 突变, 推测以上残基区域和热稳定性相关, 也符合已有文献报道的情况。此外 StTPL 中的 Thr407 对热稳定性也有贡献, 若突变 CfTPL 或 FnTPL 以提升热稳定性, 可以考虑选择 407 残基或附近区域进行突变尝试。

参考文献

- [1] 常俊俊.酶催化生物合成 L-酪氨酸研究[D].南京:南京大学,2014
CHANG Junjun. Enzyme catalytic biosynthesis L-tyrosine research [D]. Nanjing: Nanjing University, 2014
- [2] 李国四.生物催化级联反应制备丙酮酸及 L-酪氨酸衍生物[D].杭州:浙江大学,2020
LI Guosi. Biocatalytic cascade for the preparation of pyruvate and L-tyrosine derivatives [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020
- [3] 陈明亮,张利坤,杨卫华,等.三酶偶联全细胞生物合成 L-酪氨酸[J].精细化工,2019,36(3):455-460
CHEN Mingliang, ZHANG Likun, YANG Weihua, et al. Trienzyme-coupled whole-cell biosynthesis L-tyrosine [J]. Fine Chemical, 2019, 36(3): 455-460
- [4] Kim, Do-Young, Rha, et al. Development of bioreactor system for L-tyrosine synthesis using thermostable tyrosine phenol-lyase [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 17(1): 116-122
- [5] E Blake Watkins, Robert S. Inhibition of tyrosine phenol-lyase from *Citrobacter freundii* by 2-azatyrosine and 3-azatyrosine [J]. Phillips Biochemistry, 2001, 40(49): 14862-14868
- [6] Chen H, Paul G, Phillips R S. Site-directed mutagenesis of His343Ala in *Citrobacter freundii* tyrosine phenol-lyase. Effects on the kinetic mechanism and rate-determining step [J]. Eur J Biochem, 1995, 229(2): 540-549
- [7] Lee S G, Hong S P, Kim D Y, et al. Inactivation of tyrosine phenol-lyase by Pictet-Spengler reaction and alleviation by T15A mutation on intertwined N-terminal arm [J]. Febs Journal, 2010, 273(24): 5564-5573
- [8] Rha E, Kim S, Choi S L, et al. Simultaneous improvement of catalytic activity and thermal stability of tyrosine phenol-lyase by directed evolution [J]. Febs Journal, 2010, 276(21): 6187-6194
- [9] Zheng R C, Tang X L, Suo H, et al. Biochemical characterization of a novel tyrosine phenol-lyase from *Fusobacterium nucleatum* for highly efficient biosynthesis of l-DOPA [J]. Enzyme & Microbial Technology, 2018, 112: 88
- [10] Han H, Zeng W, Du G, et al. Site-directed mutagenesis to improve the thermostability of tyrosine phenol-lyase [J]. Journal of Biotechnology, 2020, 310: 6-12
- [11] Tong X, El-Zahab B, Zhao X, et al. Enzymatic synthesis of L-lactic acid from carbon dioxide and ethanol with an inherent cofactor regeneration cycle [J]. Biotechnology & Bioengineering, 2011, 108(2): 465-469
- [12] 杨宁.白假丝酵母脂肪酶 CaLIP5 的重组表达及性质研究[D].广州:华南理工大学,2011
YANG Ning. Study on the recombinant expression and properties of *Candida albicans* lipase CaLIP5 [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2011
- [13] Zheng R C, Tang X L, Suo H, et al. Biochemical characterization of a novel tyrosine phenol-lyase from *Fusobacterium nucleatum* for highly efficient biosynthesis of l-DOPA [J]. Enzyme Microb Technol, 2018, 112: 88-93
- [14] Lee S G, Hong S P, Choi Y H, et al. Thermostable tyrosine phenol-lyase of *Symbiobacterium* sp. SC-1: gene cloning, sequence determination, and overproduction in *Escherichia coli* [J]. Protein Expression and Purification, 1997, 11(3): 263-270
- [15] Li K, Liu J Y, Bai Y H, et al. Effect of bamboo shoot dietary fiber on gel quality, thermal stability and secondary structure changes of pork salt-soluble proteins [J]. CyTA - Journal of Food, 2019, 17(1): 706-715
- [16] Vieille C, Zeikus J G. Thermozyms: identifying molecular determinants of protein structural and functional stability [J]. Trends in Biotechnology, 1996, 14(6): 183-190
- [17] 朱国萍,滕脉坤,王玉珍.脯氨酸对蛋白质热稳定性的贡献[J].生物工程进展,2000,4:48-51
ZHU Guoping, TENG Maikun, WANG Yuzhen. Contribution of proline to protein thermal stability [J]. Advances in Bioengineering, 2000, 4: 48-51
- [18] Rha E, Kim S, Choi S L, et al. Simultaneous improvement of catalytic activity and thermal stability of tyrosine phenol-lyase by directed evolution [J]. Febs J, 2009, 276(21): 6187-6194