

基于蛋白质折叠自由能分析的定点突变提高谷氨酰胺转氨酶热稳定性

童理明^{1,2}, 刘松^{1,2}, 李江华^{*1,2}, 堵国城^{1,2}, 陈坚^{1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 谷氨酰胺转氨酶(Transglutaminase, EC 2.3.2.13, TGase)广泛应用于食品、纺织等领域。为提高 TGase 的热稳定性,通过 PoPMuSiC-2.1 预测了降低 *Streptomyces hygroscopicus* TGase 分子折叠能的氨基酸位点,并构建了相应的突变体。PoPMuSiC-2.1 预测结果显示,替换 P132 的氨基酸引起 TGase 折叠自由能下降的幅度最大。基于此,通过定点突变分别构建了低折叠自由能的突变体 P132I、P132G、P132M、P132Q。酶学分析表明,P132I 在 50 °C 下的半衰期达到 5.0 min,较野生酶提高 31%;其它突变体则较野生酶提高 2%~13.7%。此外,P132I 和 P132G 比酶活亦分别较野生酶提高 24%和 12.4%,其它突变比酶活变化不明显。作用力分析发现,突变体 P132I 中较野生 TGase 增加两个氢键。上述结果表明,基于蛋白质折叠自由能分析的定点突变能有效地提高 TGase 的热稳定性与催化活性,氢键的增加可能是 P132I 热稳定性提高的原因之一。

关键词: 谷氨酰胺转氨酶;蛋白质折叠自由能;定点突变;热稳定性

中图分类号:Q 814 文献标志码:A 文章编号:1673-1689(2018)12-1278-06

Improvement of TGase Thermal Stability through Site-Directed Mutagenesis Based on Analysis of Folding Free Energy

TONG Liming^{1,2}, LIU Song^{1,2}, LI Jianghua^{*1,2}, DU Guocheng^{1,2}, CHEN Jian^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Transglutaminases (EC 2.3.2.13, TGase) is an industrial enzyme widely used in several domains that include food processing and textile industry. The amino acid sites that may reduce folding free energy were predicted by using PoPMuSiC-2.1 to improve the thermal stability of TGase, and the corresponding mutants were then constructed. As indicated by PoPMuSiC-2.1 analysis, mutation at P132 revealed the highest level of decreases in folding free energy of TGase. Based on this prediction, the mutants with decreased folding free energy was thus contracted,

收稿日期: 2015-12-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31771913);江苏省重点研发计划社会发展项目(BE2016629)。

* 通信作者: 李江华(1966—),男,江西九江人,工学博士,教授,博士研究生导师,主要从事酶技术发酵过程优化与控制方面的研究。

E-mail: lijiahua@jiangnan.edu.cn

引用本文: 童理明,刘松,李江华,等. 基于蛋白质折叠自由能分析的定点突变提高谷氨酰胺转氨酶热稳定性[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(12): 1278-1283.

including P132I,P132G,P132M,and P132Q. The analysis of enzymatic property showed that the half-life of P132I can reach 5.0 min at 50 °C which was 31% higher than that of wild-type TGase, and the other mutants also exhibited enhanced half-life. Moreover,P132I and P132G showed 24% and 12.4% enhanced specific activities in contrast to wild-type enzyme,respectively;while the specific activities of the rest mutants did not change significantly. And the structure analysis indicated that P132I mutant formed additional two hydrogen bonds as compared with wild-type enzyme. These results suggested that site-directed mutagenesis based on analysis of folding free energy is an effective method to improve the thermal stability of TGase,and newly formed hydrogen bond may be one of the reasons for enhanced thermal stability of P132I.

Keywords: transglutaminase,folding free energy,site-directed mutagenesis,thermal stability

谷氨酰胺转氨酶(Transglutaminase,EC 2.3.2.13, TGase),是一种能够发生酰胺基转移反应,最后形成 ϵ -(γ -谷氨酰基)赖氨酸共价键的蛋白质^[1]。基于上述催化反应的存在,TGase 能够促使各种蛋白质分子间、分子内交联以及谷氨酰胺残基的水解,从而提高蛋白质的各种功能性质,比如乳化性、溶解性等^[2];同时,TGase 能够通过将一些小分子物质比如赖氨酸等引入蛋白质,来增加蛋白质的营养价值^[3]。因此,市场上广泛应用 TGase 作为别具特色的食品添加剂于面制品、乳制品、焙烤制品、肉制品及水产品等食品的加工处理,市场需求量极其巨大^[3-4]。

TGase 特殊的催化能力使其在食品、纺织等工业生产中具有广泛应用,但其催化活性较低、热稳定性较差,使得 TGase 作为优良的催化剂在工业中的应用受到了严重限制^[5-6]。因此,目前研究的热点大部分都集中于如何提高 TGase 的热稳定性。作为最重要的蛋白质热力学参数之一,蛋白质折叠自由能(ΔG)是反应蛋白质的热稳定性的一种通用性指标^[7]。在运用定点突变方法改造酶分子的过程中,酶突变体的 ΔG 越小,其稳定性反而越高^[7]。随着生物信息学的发展,部分软件已经可以通过对序列或结构文件的分析来预测酶分子 ΔG ,如 FoldX^[8]、PoPMuSiC 等^[9]。我们可以基于折叠能的下降水平,再通过这些软件,确定合适的突变位点。

在本研究中,首先应用 PoPMuSiC-2.1 分析 TGase 突变体折叠自由能的变化值(即 $\Delta\Delta G=\Delta G$ (突变体)- ΔG (野生酶))^[9],之后确定了 $\Delta\Delta G$ 变化较大的 P132 位点为影响 TGase 酶热稳定性的关键点,并构建得到热稳定性提高的 TGase 突变体。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 作者所在实验室前期构建保存的表达质粒 pET-22b (+)/pro-TG: 用于表达 *S. hygroscopicus* pro-TGase^[10]; 大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 和 *E. coli* BL21 (DE3): 来自 Qiagen 公司(美国)。

1.1.2 培养基 种子培养基(LB): 酵母粉 5 g/L,胰蛋白胨 10 g/L,NaCl 10 g/L;pH 7.0。

发酵培养基(TB): 酵母粉 24 g/L,胰蛋白胨 12 g/L,甘油 5 g/L,K₂HPO₄ 72 mmol/L,KH₂PO₄ 17 mmol/L;pH 7.4。

1.2 方法

1.2.1 突变体的构建 将 TGase 成熟酶基因中的 P132 位点分别突变成 P132I、P132G、P132M、P132Q。以 *S. hygroscopicus* pro-TGase 表达质粒 pET-22b(+)/pro-TG 为模板,进行全质粒 PCR,引物见表 1。

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列 5'-3'
P132I 上游	ATTTACCCGACGAACAAATTGGCG
P132Q 上游	CAATACCCGACGAACAAATTGGCG
P132M 上游	ATGTACCCGACGAACAAATTGGCG
P132G 上游	GGTTACCCGACGAACAAATTGGCG
P132 下游	GCCCGAATTGACCCAGGTGA

1.2.2 胶回收 详细说明参见胶回收试剂盒的产品说明书(TAKARA 公司)。

1.2.3 转化 将连接好的 pET-22b (+)/pro-TG 转进 JM109, 测序正确后转进 *E. coli* BL21(DE3)。

1.2.4 培养方法 种子培养条件: LB 培养基, 用 250 mL 摇瓶培养, 装液量 10%, 培养温度 37 °C, 转速 220 r/min, 培养时间 10 h。

摇瓶发酵条件: TB 培养基, 采用 250 mL 摇瓶进行培养, 装液量 10%, 接种体积分数 3%, 培养温度 37 °C, 转速 220 r/min, 当 OD₆₀₀ 达到 2.0 时, 终浓度为 0.4 mmol/mL 的 IPTG 诱导, 20 °C 诱导培养 48 h。

1.2.5 TGase 蛋白纯化 将重组菌株的发酵液经过 12 000 r/min 离心后收集发酵上清液。将发酵上清液采用微孔滤膜 (0.25 μm) 过滤去除杂质后, 将样品进样, 注入 AKTA 蛋白纯化仪的镍柱。上样缓冲液 A 液: 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4)、0.3 mol/L

NaCl、20 mmol/L 咪唑; 洗脱缓冲液 B 液: 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4)、0.3 mol/L NaCl、250 mmol/L 咪唑。流速为 1.0 mL/min, 洗脱样品时的洗脱液含 16.7% B 液^[11]。

1.2.6 pro-TGase 的体外活化及 TGase 酶活力测定 向 40 μL 野生或突变 pro-TGase 发酵上清液中加入 2 μL 的中性蛋白酶 dispase (0.1 mg/mL), 混合均匀, 37 °C 水浴 10 min^[12]。

比色法测定酶活^[13]。L-谷氨酸-γ-单羟胺酸作为标准曲线, α-N-CBZ-GLN-GLY 为底物。1 个单位的 TGase 酶活定义为: 在 37 °C 的条件下, 每分钟催化上述底物合成 1 μmol 的 L-谷氨酸-γ-单羟胺酸所用的酶量 (U/mL)。酶活测定条件为 37 °C 下反应 10 min, 酶催化反应见图 1。

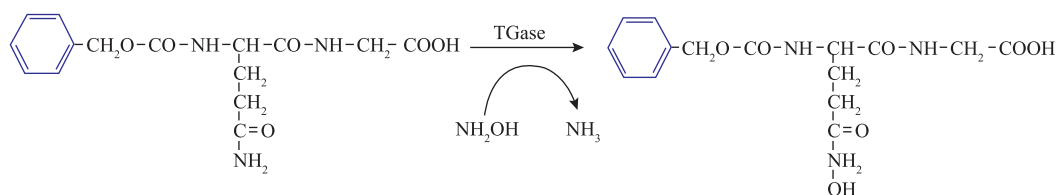


图 1 TGase 酶催化反应机制

Fig. 1 Catalytic reaction mechanism of TGase

1.2.7 TGase 酶学参数测定 测定 TGase 酶反应的动力学参数 (K_m 、 k_{cat}) 条件: 温度 37 °C, 底物质量浓度范围为 0~30 g/L。通过 Eadie-Hofstee 方程计算可得动力学参数 K_m 值。

半衰期检测 ($t_{1/2}$): 将纯化后的突变 TGase 稀释到同一质量浓度, 放置于 50 °C 水浴保温 25 min, 每隔 3 分钟取样测 TGase 酶残余活力。蛋白质的半衰期 ($t_{1/2}$) 可通过作活力-时间的关系图, 由曲线末端直线部分的斜率 (k) 解得。

1.2.8 软件分析 酶分子的折叠自由能变化值 $\Delta\Delta G$ 由 PoPMuSiC-2.1 (<http://dezyme.com>) 计算。利用在线服务器 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>), 以 PDB 数据 S.mobaraensis pro-TGase (PDB No. 3iu0A)^[14] 晶体结构为模板, 同源模拟 *S. hygroscopicus* TGase 晶体结构。TGase 晶体结构由软件 Discovery studio 分析。

2 结果与讨论

2.1 突变位点的选择

PoPMuSiC-2.1 可快速分析各氨基酸位点替换

为其它氨基酸对应 TGase 突变体的折叠能, 并由此计算得到各氨基酸位点的折叠能变化值 $\Delta\Delta G$ 。利用 PoPMuSiC-2.1 对 *S. hygroscopicus* TGase 氨基酸序列进行扫描, 得到了各氨基酸位点对应的 $\Delta\Delta G$ 之和, 见图 2。一般认为, $\Delta\Delta G$ 值越小的氨基酸位点, 突变后对酶分子热稳定性的提高越明显^[15]。基于此, 取 TGase 序列中 $\Delta\Delta G$ 之和最小的位点 P132 作为改造靶点, 以期提高其热稳定性。为考察不同 $\Delta\Delta G$ 值对酶稳定性的影响, 拟将 P132 分别突变为异亮氨酸 (P132I)、谷氨酰胺 (P132Q)、甘氨酸 (P132G) 及蛋氨酸 (P132M) 等, 其 $\Delta\Delta G$ 依次增加, 见表 2。

2.2 TGase 突变体的分泌表达

前期研究发现, TGase 以酶原 pro-TGase 形式在链霉菌中表达, 其 N 端前导肽对 TGase 大肠菌中的正确折叠有重要影响; 在重组表达体系中, 一般通过体外添加活化蛋白酶切割 pro-TGase 前导肽下得到成熟 TGase^[16]。在本研究中, 以酶原 pro-TGase 的形式在大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 为宿主分泌表达了 TGase 及突变体 (P132Q、P132I、P132G、P132M)。经蛋白酶活化, 表达 P132Q、P132I、P132G、

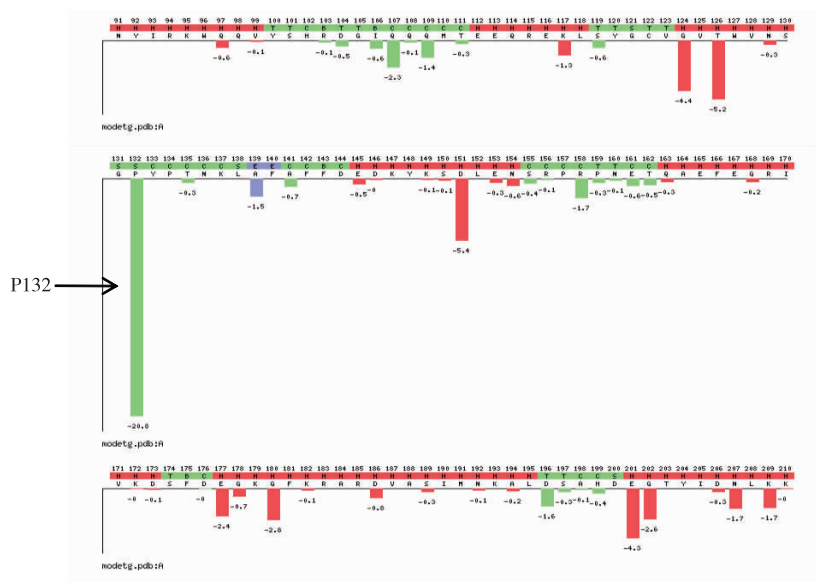
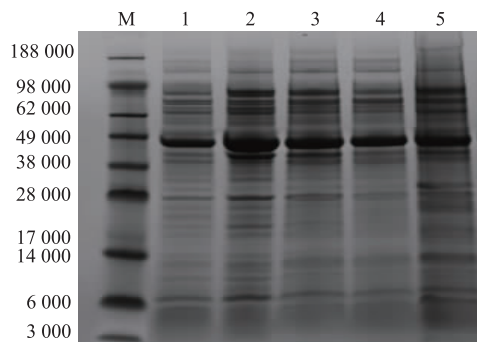
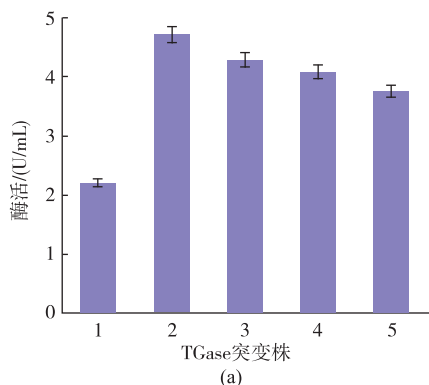


图2 *S. hygroscopicus* TGase 氨基酸序列中的 $\Delta\Delta G$ 值
Fig. 2 $\Delta\Delta G$ value in *S. hygroscopicus* TGase sequence

P132M 的重组菌胞外 TGase 酶活分别较突变前提高了 115%、85%、71%和 94%,见图 3(a)。蛋白质电泳分析显示,表达突变体的重组菌上清液的 pro-TGase 条带(42 500)较改造前的重组菌明显增粗,见图 3 (b)。上述结果表明,重组 P132Q、P132I、P132G 和 P132M 的 pro-TGase 在大肠杆菌中高效分泌。

表 2 TGase 突变体的 $\Delta\Delta G$ 值
Table 2 $\Delta\Delta G$ value of TGase mutants

突变株	$\Delta\Delta G/(\text{kcal/mol})$
P132I	-1.62
P132M	-1.43
P132Q	-1.13
P132G	-0.06



M: 蛋白分子质量标准; 1: 野生型 TGase; 2: P132Q; 3: P132M; 4: P132I; 5: P132G

(b)

M: 蛋白质相对分子质量标准; 1: 野生型 TGase; 2: P132Q; 3: P132M; 4: P132I; 5: P132G

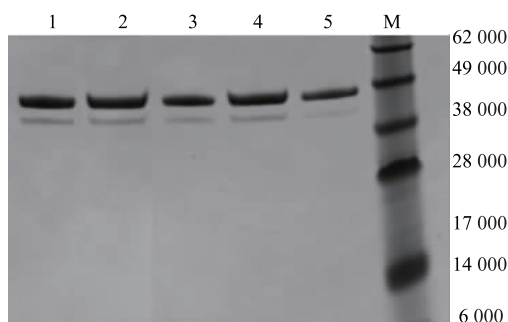
图 3 重组 *E. coli* BL21 (DE3) 胞外 TGase 突变体酶活及 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 3 Activity and SDS -PAGE analysis of TGase mutants in culture supernatant of recombinant *E. coli* BL21 (DE3)

2.3 重组 TGase 的纯化以及酶学性质分析

含突变体发酵的上清经镍柱分离后获得电泳纯的突变体(图 4),并分析了纯酶的酶学性质。结果显示,突变体 P132I、P132G、P132Q 和 P132M 在 50 ℃下的半衰期 $t_{1/2}$ 较野生酶提高了 2%~31%, 其中 P132I 达到 5.0 min, 见表 3。此外,P132I 和 P132G 比酶活亦分别较野生酶提高 24%和 12.4%, 其它突变比酶活变化不明显。与比酶活变化相对应,P132I

和 P132G 的 K_m 较野生酶降低, 而 k_{cat} 略有提高; P132M 及 P132Q 的变化趋势相反。上述结果表明, P132I 和 P132G 热稳定性和催化活性相比野生酶有较为明显的提高, 进一步增强了底物的亲和力以及催化效率。



M: 蛋白质相对分子质量标准; 1: P132Q; 2: P132M; 3: P132I; 4: P132G; 5: 野生 pro-TGase

图 4 纯化的 pro-TGase 及其突变体 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified pro-TGase mutants

表 3 TGase 及突变体的酶学性质

Table 3 Enzymatic properties of TGase and its mutants

菌株	$t_{1/2}$ (min, 50 °C)	比酶活/(U/mg)	K_m /(mmol/L)	k_{cat} /s ⁻¹
野生 TGase	3.8±0.4	20.1±2.1	54.14±1.7	17.07±2.1
P132I	5.0±0.6	25.0±1.9	42.25±1.9	22.1±3.0
P132G	4.3±0.4	22.6±1.8	45.26±2.0	20.08±2.8
P132M	4.4±0.5	19.3±2.0	58.38±2.8	17.05±2.5
P132Q	3.9±0.8	19.0±2.5	59.30±1.8	16.86±3.2

2.4 P132I 的稳定化机制分析

研究表明, 蛋白质分子内作用力的种类和数量对酶分子热稳定性和催化活性产生重要影响^[17]。为解析 TGase 突变体 P132I 的分子机制, 构建了 *S. hygroscopicus* TGase 模拟结构并分析了分子内作用力的变化。P132 处于酶分子内部的 loop 结构上, 增加 P132 与其它基团的作用力有利于提高 loop 结构的刚性, 进而提高酶分子的热稳定性。作用力分析显示, 在野生 TGase 中, P132 仅与 S130 和 Y127 形成两个氢键; 而在突变体 P132I 中, I132 与 S130 和 Y127 形成了 4 个氢键, 见图 5。氢键是酶分子稳定的重要作用力之一, 一个氢键可为蛋白质的维持提供 0.6 kcal/mol 的能量^[18]。因此, P132I 热稳定性提高的原因之一极有可能是因为氢键的增加^[19]。

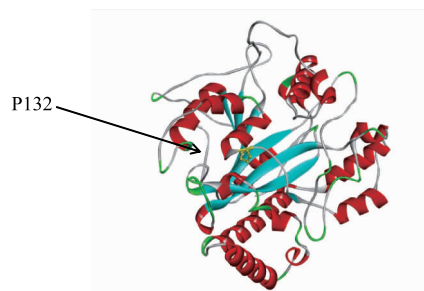


图 5 *S. hygroscopicus* TGase 模拟结构

Fig. 5 Modeling structure of *S. hygroscopicus* TGase

除此之外, 在突变株 P132I 中, 132 位异亮氨酸较野生酶中的脯氨酸疏水性更强。大量的研究显示, 降低蛋白质表面的疏水性或增加蛋白质内部的疏水性, 能够提高蛋白质的稳定性^[20-21]。如有研究者将乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase) 表面疏水氨基酸 L471 突变成亲水性更高的酪氨酸, 酶热稳定性提高了 3 倍^[22]。因此, 分子内部疏水性的提高, 也可能是导致 P132I 热稳定提高的另一原因。

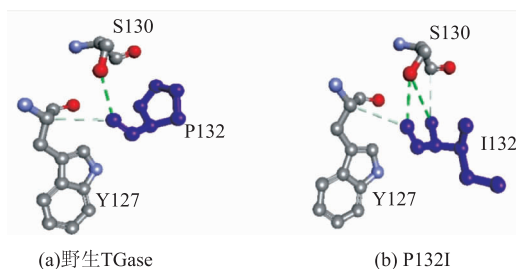


图 6 TGase 及突变体分子中 132 氨基酸形成的氢键

Fig. 6 Hydrogen bond formed by amino acid 132 in TGase and its mutants

3 结语

TGase 应用广泛, 包括纺织、食品、造纸和环境领域等。然而, 其应用的推广却受限于其较低的热稳定性。本研究通过折叠能分析软件 PoPMuSiC-2.1 发现了 *S. hygroscopicus* TGase 分子中 $\Delta\Delta G$ 最小的位点 P132, 确定该位点为提高 TGase 热稳定性的潜在位点。在构建得到的突变体中, P132I 的 50 °C 半衰期和比酶活分别较野生酶提高 31% 和 24%, 这个结果表明, 基于折叠能分析的定点突变策略能有效地提高 TGase 的热稳定性。在下一步研究中, 将使用构建 P132I 高效分泌表达系统, 以期实现高热稳定性和高催化活性 TGase 工业化生产。

参考文献:

- [1] BENINATI S, BERGAMINI C M, PIACENTINI M. An overview of the first 50 years of transglutaminase research[J]. **Amino Acids**, 2009, 36(4): 591-598.
- [2] YOKOYAMA K, NIO N, KIKUCHI Y. Properties and applications of microbial transglutaminase[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2004, 64(4): 447-454.
- [3] MOTOKI M, SEGURO K. Transglutaminase and its use for food processing[J]. **Trends in Food Science & Technology**, 1998, 9(5): 204-210.
- [4] SANTOS M, TORNE J. Recent patents on transglutaminase production and applications; a brief review[J]. **Recent Patents on Biotechnology**, 2009, 3(3): 166-174.
- [5] BOMMARIUS A S, BLUM J K, ABRAHAMSON M J. Status of protein engineering for biocatalysts; how to design an industrially useful biocatalyst[J]. **Current Opinion in Chemical Biology**, 2011, 15(2): 194-200.
- [6] Ó'FAGAIN C. Enzyme stabilization—recent experimental progress[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2003, 33(2): 137-149.
- [7] 田健. 计算机辅助分子设计提高蛋白质热稳定性的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
- [8] SCHYMKOWITZ J, BORG J, STRICHER F, et al. The FoldX web server: an online force field[J]. **Nucleic Acids Research**, 2005, 33(suppl 2): W382-W388.
- [9] ZHANG S B, WU Z L. Identification of amino acid residues responsible for increased thermostability of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger* using the PoPMuSiC algorithm[J]. **Bioresource Technology**, 2011, 102(2): 2093-2096.
- [10] LIU S, ZHANG D, WANG M, et al. The order of expression is a key factor in the production of active transglutaminase in *Escherichia coli* by co-expression with its pro-peptide[J]. **Microb Cell Fact**, 2011, 10(112): 1-7.
- [11] 陈康康. 分子改造强化 *Streptomyces hygroscopicus* 谷氨酰胺转氨酶催化性能研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [12] MARX C K, HERTEL T C, PIETZSCH M. Purification and activation of a recombinant histidine-tagged pro-transglutaminase after soluble expression in *Escherichia coli* and partial characterization of the active enzyme[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2008, 42(7): 568-575.
- [13] GROSSOWICZ N, WAINFAN E, BOREK E, et al. The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine [J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1950, 187(1): 111-125.
- [14] YANG M T, CHANG C H, WANG J M, et al. Crystal structure and inhibition studies of transglutaminase from *Streptomyces mobaraense*[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2011, 286(9): 7301-7307.
- [15] GILIS D, ROOMAN M. PoPMuSiC, an algorithm for predicting protein mutant stability changes[J]. **Application to Prion Proteins Protein engineering**, 2000, 13(12): 849-856.
- [16] CHEONG D E, KO K C, HAN Y, et al. Enhancing functional expression of heterologous proteins through random substitution of genetic codes in the 5' coding region[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2015, 112(4): 822-826.
- [17] XIE Y, AN J, YANG G, et al. Enhanced enzyme kinetic stability by increasing rigidity within the active site[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2014, 289(11): 7994-8006.
- [18] MABROUK S B, AGHAJARI N, ALI M B, et al. Enhancement of the thermostability of the maltogenic amylase MAUS149 by Gly312Ala and Lys436Arg substitutions[J]. **Bioresource Technology**, 2011, 102(2): 1740-1746.
- [19] TANNER J J, HECHT R M, KRAUSE K L. Determinants of enzyme thermostability observed in the molecular structure of *Thermus aquaticus* D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at 2.5 Å resolution[J]. **Biochemistry**, 1996, 35(8): 2597-2609.
- [20] CRISWELL A R, BAE E, STEC B, et al. Structures of thermophilic and mesophilic adenylate kinases from the genus *Methanococcus*[J]. **Journal of Molecular Biology**, 2003, 330(5): 1087-1099.
- [21] TAN Zhongbiao, LI Jianfang, WU Minchen. Research advance on engineering thermostability of lipase[J]. **Journal of food Science and Biotechnology**, 2014, 33(7): 673-681.
- [22] STRUB C, ALIES C, LOUGARRE A, et al. Mutation of exposed hydrophobic amino acids to arginine to increase protein stability [J]. **BMC Biochemistry**, 2004, 5(1): 9.