

doi: 10.3969/j.issn.1672-5565.2013.04.08

野葛葡萄糖基转移酶 PIUGTs 的同源建模及其活性位点分析

郑敏婧, 李晓云*, 李玲

(华南师范大学生命科学学院, 广州 510631)

摘要: 本文对 PIUGTs 进行同源建模, 并分析其与底物结合的构象及活性位点。通过 SWISS-MODEL 在线对 PIUGTs 进行模板预测和选择, 运用 Swiss-PdbViewer 软件显示和优化, 利用 ACDLABS 绘制糖基供体小分子(酶结合底物), 最后通过 AutoDock_ADIT 进行分子对接, 并分析 PIUGTs 酶与不同底物结合的整体构象及分析活性位点。研究结果表明 PIUGT1、PIUGT2 及 PIUGT3 均能得到较好的三级构象, 并且 PIUGT1、PIUGT2 与三种底物均可进行较好对接, H₁₈, R₂₇₈, N₃₅₉ 为 PIUGT1 与三种对接构象活性中心所共有的氨基残基; 而 G₁₆, H₁₇, V₁₉, T₁₄₈, N₃₇₀, E₃₇₄, E₃₉₀ 为 PIUGT2 与三种对接构象活性中心所共有的氨基残基, 但 PIUGT3 未能得到较好的对接构象。由此推测 PIUGT1 和 PIUGT2 均能合成葛根素, 而 PIUGT3 不能催化葛根素的合成。

关键词: PIUGT; 同源建模; 分子对接

中图分类号: R978.1+6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-5565(2013)-04-287-06

Homology modeling of glucosyltransferases from *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi and the analysis of the active motif

ZHENG Min-jing, LI Xiao-yun*, LI Ling

(South China normal University, Guang Zhou 510631, China)

Abstract: In this paper, we present the homology modeling on PIUGTs and the analysis of its active motif and conformation with the substrate. We selected PIUGTs based on the SWISS-MODEL online template predictions, used the Swiss-PdbViewer for displaying and optimization, drawn glycosyl donor molecules by ACDLABS (enzyme substrate), did molecular docking through the AutoDock_ADIT, and analyzed the overall PIUGTs' active motif and conformation with the substrates. As a result, PIUGT1, PIUGT2 and PIUGT3 all can get good tertiary conformations, while PIUGT1 and PIUGT2 have good docking with three substrates. H₁₈, R₂₇₈, N₃₅₉ are three kinds of amino acid residues both in the conformation of active center of PIUGT1 combined with three substrates, G₁₆, H₁₇, V₁₉, T₁₄₈, N₃₇₀, E₃₇₄ are amino acid residues both in the conformation of active center of PIUGT2 combined with three substrates, PIUGT3 failed to get a good docking conformation. As a result, if this, we concluded conclusion speculation is that PIUGT1 and PIUGT2 can synthesis puerarin, but PIUGT3 can not catalytic synthesis puerarin.

Keywords: PIUGT; Homology Modeling; Molecular Docking

葛根素是豆科葛属植物野葛干燥根中独有的有效药用成分, 在临床上可用于治疗心血管疾病、糖尿病和代谢综合症等, 具有较高的药用价值和经济价值。野葛葡萄糖基转移酶将活性糖基从核苷糖[通常是尿嘧啶核苷二磷酸-葡萄糖(UDP-glucose)]转移到一系列小分子化合物受体上形成糖苷化合物, 是野葛独特药用成分葛根素生物合成的关键酶^[1]。

目前, 葛根素作为药品资源, 市场需求量大, 由于长期采挖野生野葛, 使自然资源日益缺乏, 而人工栽培的野葛品种质量退化, 限制了葛根素的生产规模。因此从野葛中克隆葡萄糖基转移酶基因并进行功能分析, 对调节葛根素代谢工程具有重要的理论意义和应用价值。

本课题组前期采用 RT-PCR 并结合 3' 和 5'

收稿日期: 2013-07-04; 修回日期: 2013-11-04.

基金项目: 广东省科技计划支持项目(2009B020301003)资助。

作者简介: 郑敏婧, 女, 硕士研究生, 研究方向: 微生物与生化药学; E-mail: 59740663@qq.com.

* 通讯作者: 李晓云, 女, 博士后, 研究方向: 植物细胞工程; E-mail: 350009946@qq.com.

RACE 技术,从野葛中克隆得到了三种野葛葡糖基转移酶基因(分别命名为 *PIUGT1*、*PIUGT2*、*PIUGT3*, Genbank 注册号分别为: EU889119、EU889120、EU889121)。序列比对表明, *PIUGT1*、*PIUGT2*、*PIUGT3* 与其他已知糖基转移酶具有较高的同源性,含有糖基转移酶的保守区域 PSPG box^[2]。 *PIUGT1* 的开放读码框(ORF)全长 1 398 bp,编码 465 个氨基酸; *PIUGT2* 的 ORF 为 1 419 bp,编码 472 个氨基酸; *PIUGT3* 的 ORF 为 1 428 bp,编码 475 个氨基酸。半定量 RT-PCR 表明, *PIUGT1*、*PIUGT2* 和 *PIUGT3* 在野葛叶和根中均有表达,表达强度差异不大。 *PIUGT1* 在野葛根和叶中的表达量较高^[3]。利用毕赤酵母表达载体分别构建了野葛葡糖基转移酶基因 *PIUGT1* 的胞外和胞内表达载体 *pPICZαA-PIUGT1* 和 *pPICZA-PIUGT1*^[4]。继而,以重组质粒转化表达宿主菌 GS115,成功诱导表达 *PIUGT1* 蛋白^[5]。此外,通过原核表达也成功诱导 *PIUGT1*、*PIUGT2* 和 *PIUGT3* 目的蛋白^[6]。本文旨在通过对 *PIUGT1*、*PIUGT2*、*PIUGT3* 三种野葛葡糖基转移酶进行同源建模及与相关底物的作用位点分析,预测其生物活性,为此酶改造工程提供依据和参考。

1 材料与amp;方法

1.1 序列来源

野葛葡糖基转移酶 *PIUGT1*、*PIUGT2*、*PIUGT3*

蛋白序列均来自于 NCBI, GenBank 登录号分别为 EU889119、EU889120、EU889121。

1.2 同源建模

将 *PIUGT1*、*PIUGT2*、*PIUGT3* 蛋白序列提交到 SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>)中进行模板搜索与选择^[7],并通过 Swiss-PdbViewer 进行蛋白结构显示和优化^[8-9]。

1.3 底物分子生成和优化

通过 ACDLABS 12.0 绘制 UDP-葡萄糖(UDP-glucose, UDPG),大豆昔元(Daidzein, DD),异甘草素(Isoliquiritigenin, ISL)和槲皮素(Quercetin, Qct)的化学结构式,转换三维结构和进行结构优化^[10]。

1.4 活性位点分析

用 AutoDock_ADT 进行 *PIUGTs* 酶与底物对接,并进行整体构象及活性中心位点分析^[11]。

2 结果与分析

2.1 *PIUGTs* 蛋白的同源建模

通过序列比对, *PIUGT1*、*PIUGT2*、*PIUGT3* 和已知的糖基转移酶基因 *BUGT2B1*、*HQ219047*、*EU889123* 具有很高的源性和保守的位点,序列比对如图 1。 *PIUGT1* 以 2c1zA(1.90 Å)为模板进行同源建模,序列同源性即 Sequence Identity (SI) = 22.18%, QMEAN = 0.57(QMEAN 值为 0~1 之间,

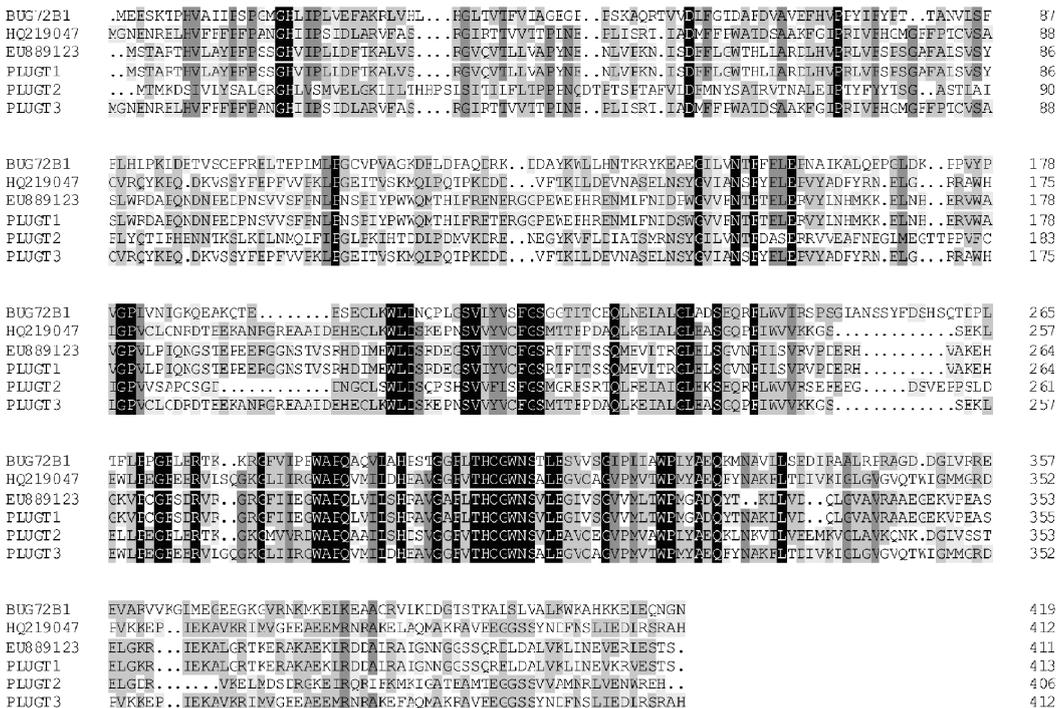


图 1 序列比对结果

Fig.1 Results of sequence alignment

所得到的值越大,获得较好模型的可能性也就越大)(见图2);PIUGT2和PIUGT3分别以2vg8A为模板进行建模,得到的构象见图2,其中PIUGT2的SI和QMEAN值分别为SI=33.05%,QMEAN=0.66;而PIUGT3的SI和QMEAN值分别为SI=22.18%,QMEAN=0.57。将所得模型QMEAN值与通过晶

体衍射得到的高分辨率结构的QMEAN值分布进行比较得出QMEAN的Z值,所得到的Z值一定程度上反映了评估模型是否具有与通过实验所获得结构具有相近的质量水平^[12],鉴于PIUGTs蛋白的氨基酸残基数目及其QMEAN的Z值,可以得出所获得的模型质量是较为可靠的(见图2)。

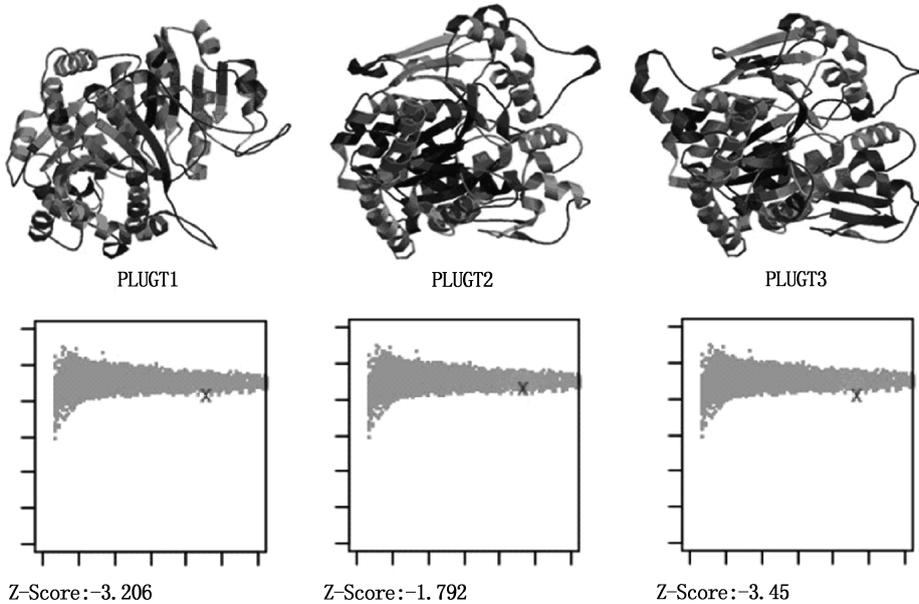


图2 同源建模获得的PIUGTs蛋白模型模型QMEAN的Z值在标准分布中的位置

Fig.2 In the PIUGTs protein model obtained from Homology modeling, the position of Z Values of QMEAN in the standard distribution

2.2 PIUGTs蛋白与底物的分子对接

将PIUGT1和PIUGT2分别与大豆昔元、异甘草素和尿嘧啶核苷二磷酸-葡萄糖进行分子对接,得

到了其对接整体构象图(见图3)。这里尿嘧啶核苷二磷酸-葡萄糖、大豆昔元及异甘草素作为糖基供体。

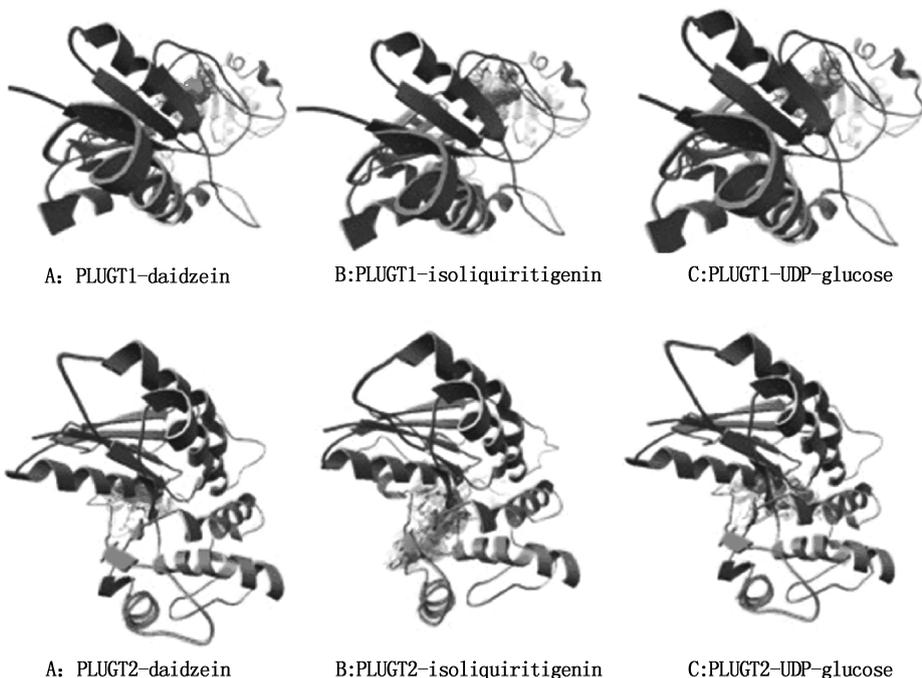


图3 PIUGT1、PIUGT2与底物结合整体构象

Fig.3 The overall conformational of PIUGT1, PIUGT2 combined with its substrates

对构象的活性中心进行分析表明,PIUGT1 与大豆甙元结合的活性中心氨基酸为 $S_{16}, G_{17}, H_{18}, F_{107}, F_{108}, S_{277}, R_{278}, N_{359}, P_{128}, S_{129}$ ($K_i = 496.57 \text{ uM}$, $\Delta G_{\text{bind}} = -4.51$). K_i 抑制剂常数, ΔG_{bind} 结合自由能,这两个值用于评价酶与底物结合的难易程度。 ΔG_{bind} 越小,结合越容易);PIUGT1 与异甘草素的活性中心氨基酸为 $G_{17}, H_{18}, I_{20}, R_{278}, Q_{380}, D_{379}, H_{355}, E_{363}, N_{359}, W_{358}, G_{357}$ ($K_i = 94.0 \text{ nM}$, $\Delta G_{\text{bind}} = -9.59$);PIUGT1 与 UDP-葡萄糖结合的活性中心氨基酸为 $H_{18}, I_{20}, N_{239}, G_{276}, R_{278}, S_{360}, E_{363}, D_{379}, W_{358}, N_{359}, H_{355}, G_{357}$ ($K_i = 141.06 \text{ uM}$, $\Delta G_{\text{bind}} = -5.25$); H_{18}, R_{278}, N_{359} 残基为 PIUGT1 与三种底物结合的活性中心中共有,表明此三个氨基酸残基为 PIUGT1 催化葛根素生成的关键位点。同理,PIUGT2 与大豆甙元结合的活性中心氨基酸为 $G_{16}, H_{17}, V_{19}, S_{20}, T_{148}, N_{222}, V_{253}, W_{369}, N_{370}, E_{374}, E_{390}$ ($K_i = 149.04 \text{ nM}$, $\Delta G_{\text{bind}} = -9.31$);PIUGT2 与异甘草素的活性中心氨基酸为 $G_{16}, H_{17}, V_{19}, S_{20}, T_{148}, N_{370}, E_{374}, E_{390}$ ($K_i = 67.4 \text{ pM}$,

$\Delta G_{\text{bind}} = -13.88$);PIUGT2 与 UDP-葡萄糖结合的活性中心氨基酸为 $G_{16}, H_{17}, V_{19}, T_{148}, W_{348}, Q_{351}, G_{368}, W_{369}, N_{370}, S_{371}, E_{374}, E_{390}$ ($K_i = 36.81 \text{ uM}$, $\Delta G_{\text{bind}} = -6.05$); $G_{16}, H_{17}, V_{19}, T_{148}, N_{370}, E_{374}, E_{390}$ 为 PIUGT2 与三种底物结合的关键氨基酸残基(见图 5)。

K_i 和 ΔG_{bind} 值表明 PIUGT3 与各种底物(大豆苷元、异甘草素、槲皮素)未能成功对接(见表 1)。综上分析,PLUTG1、PIUGT2 与大豆甙元、异甘草素及 UDP-葡萄糖均能得到较好的对接构象,推测可能为合成葛根素的糖基转移酶,而 PIUGT3 未能与底物得到较好的对接构象。经 GenBank 得知,PIUGT3 与 GT14A05 同源性极高(仅一碱基差异),而 GT14A05 能够催化木犀草素 7-OH 糖基化生成木犀草素 7-O-葡萄糖苷,及催化槲皮素 3' 和 4'-OH 的糖基化生成槲皮素-3'-O-葡萄糖苷、槲皮素-4'-O-葡萄糖苷,但转化率较低(3h 转化率 1%),从而推测 PIUGT3 可能不是合成葛根素的糖基转移酶,但仍需要进一步的实验证实。

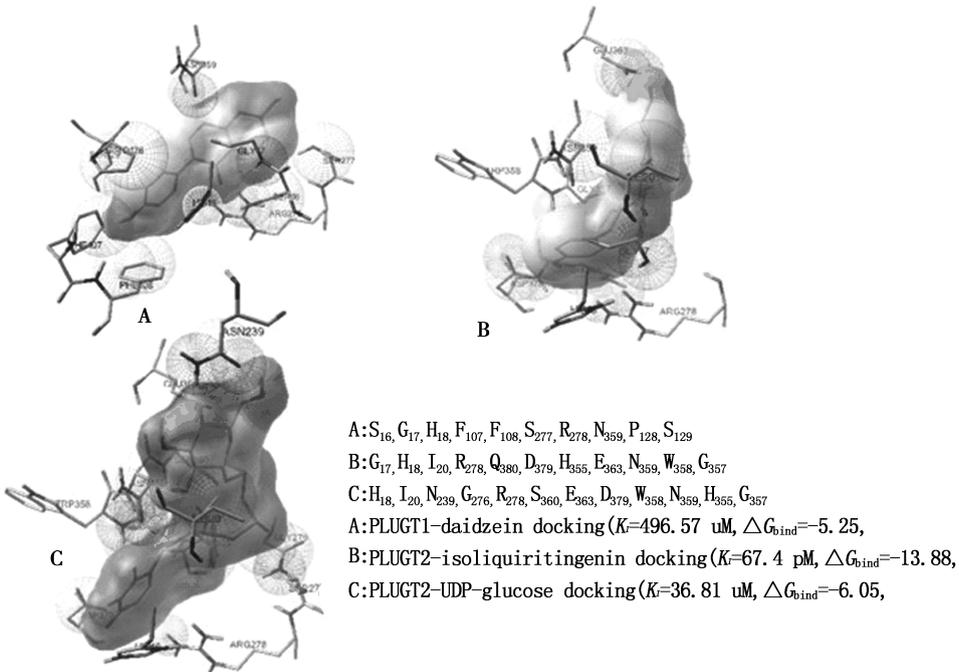


图 4 PIUGT1 与底物结合活性位点分析

Fig.4 Analysis of PIUGT1 active site combined with the substrate

注:A:PIUGT2 与大豆甙元(糖基受体)对接的活性中心;B:PIUGT2 与异甘草素(糖基受体)对接的活性中心;C:PIUGT2 与 UDP-葡萄糖(糖基供体)对接的活性中心;红色表示酶和两种糖基受体及糖基供体对接构象中共同出现的氨基酸,蓝色表示酶和其中一种糖基受体及供体对接中活性中心共同出现的氨基酸。

Notes:A: The active centre of PIUGT1 dock with Daidzein (glycosyl receptor); B: The active centre of PIUGT1 dock with Isoliquiritigenin (glycosyl receptor); C: The active centre of PIUGT1 dock with UDP-glucose (glycosyl donor); Red font means the same amino acids in the docking conformations of enzyme docked with two kinds of glycosyl receptor and glycosyl donor, blue font means the same amino acids in the docking conformations of enzyme docked with one of a kind glycosyl receptor and glycosyl donor app;addword;active centre.

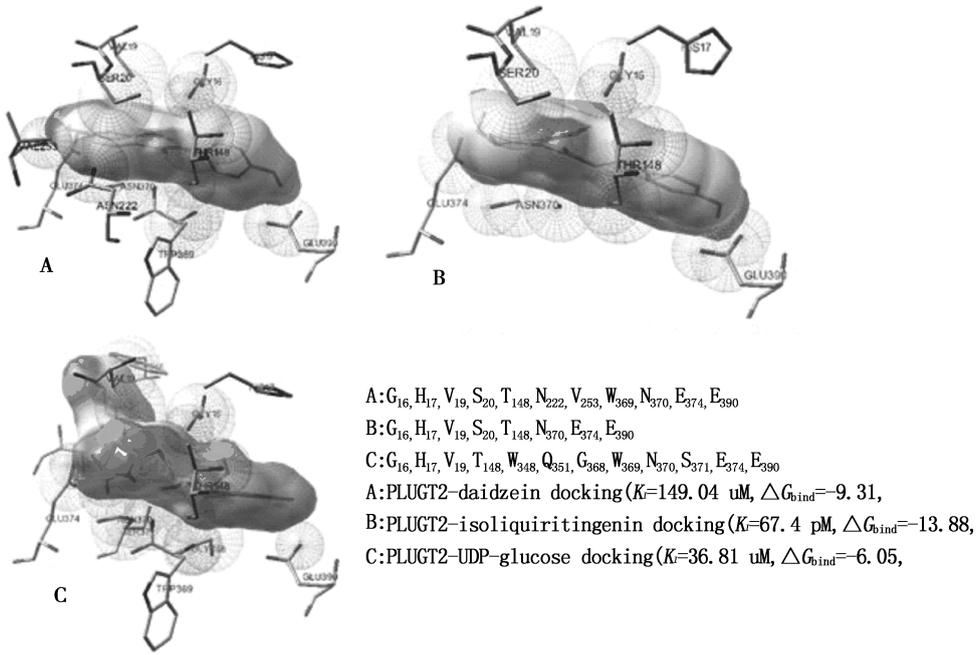


图 5 PIUGT2 与底物结合活性位点分析

Fig.5 Analysis of PIUGT2 active site combined with the substrate

注: A: PIUGT1 与大豆甾元 (糖基受体) 对接的活性中心; B: PIUGT1 与异苜蓿素 (糖基受体) 对接的活性中心; C: PIUGT1 与 UDP-葡萄糖 (糖基供体) 对接的活性中心; 红色表示酶和两种糖基受体及糖基供体对接构象中共同出现的氨基酸, 蓝色表示酶和其中一种糖基受体及供体对接中活性中心共同出现的氨基酸。

Notes: A: The active centre of PIUGT2 dock with Daidzein (glycosyl receptor); B: The active centre of PIUGT2 dock with Isoliquiritigenin (glycosyl receptor); C: The active centre of PIUGT2 dock with UDP-glucose (glycosyl donor); Red font means the same amino acids in the docking conformations of enzyme docked with two kinds of glycosyl receptor and glycosyl donor, blue font means the same amino acids in the docking conformations of enzyme docked with one of a kind glycosyl receptor and glycosyl donor.

表 1 PIUGT3 与底物结合分析结果

Table 1 Analysis of PIUGT3 combined with the substrate

Docking	Docking (aa)	k_i (uM)	G_{bind} (Kcal.mol ⁻¹)
PIUGT3-UDP	His ₂₀	Unavailable	8.4
	His ₉	NA	NA
	His ₁₀₆	Unavailable	4 100 000
	His ₁₄₀	Unavailable	349 000
	His ₂₃₈	Unavailable	1 000 000
	His ₂₆₄	Unavailable	292 000
	His ₃₆₁	Unavailable	4.64
	His ₄₇₅	NA	NA
	Ser ₈₆	Unavailable	160 000
	Ser ₃₆₆	Unavailable	4.36
PIUGT3-Daidzein	Asn ₃₆₅	Unavailable	1.88
	Arg ₂₉₉	Unavailable	1 670 000
	His ₂₀	21.98	-14.54
PIUGT3-Isoliquiritigenin	Asn ₃₆₅	387 890	-0.07
	His ₂₀	Unavailable	0.4
PIUGT3-Luteolin	Asn ₃₆₅	3.1e-026	-38.89
	His ₂₀	Unavailable	0.04
PIUGT3-Quercetin	Asn ₃₆₅	Unavailable	14.19
	His ₂₀	Unavailable	0.42
	Asn ₃₆₅	0	-64.93

3 结论

采用同源建模法对 PIUGTs 蛋白的三维结构进行了构建, 然后用分子力学和分子动力学进行了优化, 模型经 Swiss-PdbViewer 检验后认为较可靠。另外用不同的底物与得到的 PIUGTs 蛋白三维结构模型进行对接研究, 并在活性与对接之间建立了构效关系, 为进一步研究 PIUGTs 蛋白的结构与功能关系提供了理论依据, 同时为筛选 PIUGTs 蛋白的最适底物奠定了基础。

参考文献 (References)

[1] 周文灵, 陈刚, 王英华, 李玲. 植物糖基转移酶及其在代谢工程中的应用[J]. 生物技术, 2009, 19(6): 95-98.
 [2] 胡小祥, 吕旻, 周文灵, 李玲. 重组毕赤酵母体系生成 PIUGT1 蛋白适宜条件研究[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2011, 3: 103-106.
 [3] 李健涓, 吕旻, 胡小祥, 李玲. 野葛糖基转移酶 PIUGT2 蛋白原核表达及其适宜条件探讨[J]. 亚热带植物科学, 2012, 41(2): 9-12.
 [4] 周文灵, 王英华, 陈刚, 李玲. 野葛葡糖基转移酶基因 PIUGT3 的克隆与生物信息学分析[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(7): 651-656.
 [5] 吕旻. 野葛葡糖基转移酶的原核表达及其活性产物分析[D].

广州:华南师范大学,2012.

- [6] Wenling Zhou, Yinghua Wang, Gang Chen, Min Lü LixiaYang, Xiaoxiang Hu, Haihang Li and Ling Li. Cloning of a gene encoding glycosyltransferase from *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi and its expression in *Pichia pastoris* [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(1): 85-96.
- [7] Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server [J]. *Nucleic Acids Res.* 2003, 31: 3381-3385.
- [8] ARNOLD K, BORDOLI L, KOPP J, SCHWEDE. T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(2): 195-201.
- [9] Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL Repository: new features and functionalities [J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(1): 315-318.
- [10] GUEX N, PEITSCH M C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modelling [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(15): 2714-2723.
- [11] F. Jing, S. H. Kim. Soft docking: matching of molecular surface cubes [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1991, 219: 79.
- [12] Benkert P, Biasini M, Schwede T. Toward the estimation of the absolute of individual protein structure models [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(3): 343-350.