

The Structure Identifying of Coenzyme Oxidase NAD(P)H Based on Bioinformatics

Shizhen Wang, Yali Wang, Hongchun Li, Hao Li, Baishan Fang*

Department of Chemical and Biochemical Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen
Email: *fbs@xmu.edu.cn

Received: Jul. 1st, 2014; revised: Jul. 21st, 2014; accepted: Jul. 28th, 2014

Copyright © 2014 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Coenzyme regeneration is the key to promote large-scale industrial application of oxidoreductase. Coenzyme oxidase (NOX) is an ideal candidate for industrial enzymes regeneration of NADH and NADPH. Based on sequence alignment tools and other bioinformatics methods, we analyze the amino acid sequence and high-level structural characteristics of NOX proteins, laying the foundation for future researches on the identification and transformation of coenzyme oxidase. Based on bioinformatics approaches, ClustalX 2.0, PyMOL 1.0 and other related software were used, and the nicotinamide coenzyme oxidase NOXs (the infer type or the known type) from *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Methanocaldococcus jannaschii*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* are compared for sequence alignment and homology modeling. The catalytically active sites, conservative characteristics of the active site amino acid residues and reaction mechanism were analyzed. Cofactors and important amino acid residues around them were identified. A lot of comparison analyses showed that NOX catalytic active sites presented important residues—Cys42 and cofactor FAD, and highly conserved residues—His10, Leu40 or Ser40 and Gly43 around them. The results can be used to guide future enzyme screening, modification and transformation of enzyme structure at the molecular level.

Keywords

Coenzyme Oxidase, Bioinformatics, Core Structure Domain, Structure-Activity Relationship, Active Site

*通讯作者。

基于生物信息学对NAD(P)H辅酶氧化酶的结构识别

王世珍, 王雅丽, 李红春, 李昊, 方柏山*

厦门大学化学化工学院, 化工与生物化工系, 厦门

Email: lbs@xmu.edu.cn

收稿日期: 2014年7月1日; 修回日期: 2014年7月21日; 录用日期: 2014年7月28日

摘要

辅酶再生是推动氧化还原酶大规模工业化应用的关键。辅酶氧化酶(NOX)是工业上用于NADH和NADPH再生的理想用酶。基于序列比对等生物信息学手段, 分析NOX的氨基酸序列和蛋白质高级结构特点, 为今后对辅酶氧化酶的识别和改造研究奠定基础。基于生物信息学的方法, 利用ClustalX 2.0、PyMOL 1.0等相关软件, 对来源于粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*), 乳酸链球菌(*Lactococcus lactis*), 詹氏甲烷球菌(*Methanocaldococcus jannaschii*), 生殖支原体(*Mycoplasma genitalium*), 肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*), 化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)中的辅酶氧化酶(已知型或推断型)进行序列比对、同源建模, 分析其催化活性位点、活性位点的氨基酸残基保守性特点及反应机理, 识别辅基及周围重点氨基酸残基。大量的比对分析结果表明, NOX的催化活性位点存在重点作用残基Cys42和辅基FAD, 周围存在高度保守性残基His10, Leu40或Ser40和Gly43。研究结果可用于今后指导酶的筛选, 在分子层面修饰和酶结构的改造。

关键词

辅酶氧化酶, 生物信息学, 核心结构域, 构效关系, 活性位点

1. 引言

在酶的六大类型中, 30%~35%为氧化还原酶[1], 由于氧化还原酶在催化制备手性醇、羧基酸、氨基酸方面显示出极大的优势, 因此在制药、食品、精细化工、农药等领域具有重要的用途, 它的应用也越来越受到人们的重视[2]。但是大部分的氧化还原酶催化反应时都需要辅酶的存在, 尤其是烟酰胺型辅酶[NAD(P)⁺和NADPH]的参与。然而辅酶大都价格昂贵, 所以辅酶再生在工业应用上成为必须解决的问题。因此, 根据生物催化反应的过程经济性和工业可行性, 氧化还原酶在应用中除了必须有合适的酶和反应工程技术以外, 还必须提供高效、低成本的辅酶再生系统。所谓辅酶再生, 就是把辅酶从氧化态再生为还原态, 或者反之, 从而使辅酶保持在一定的催化剂量水平。此外, 辅酶再生能够简化产物的分离, 并有利于酶促反应向正反应方向移动[3]。

近些年来, 为了解决辅酶再生这一问题, 已经提出了一系列的方法, 主要有酶催化再生法和非酶催化再生法(包括化学再生法、电化学催化再生法和光化学催化再生法)[4]。其中酶法再生的方法优势明显, 反应速率快, 选择性高, 再生体系与合成体系兼容性好, 过程易于监控。与其它用于辅酶再生的氧化还原酶相比, 辅酶氧化酶具有以下优点: 以O₂为底物, 可直接将NAD(P)H氧化为NAD(P)⁺, 所以不需要

添加新的底物；没有副产物产生，终产物水不会对与之耦联的酶产生抑制，不需额外引入其他底物和产生副产物。因此，辅酶氧化酶成为工业上用于 NADH 和 NADPH 再生的理想用酶。

本研究基于这样的背景，以生物信息学的研究方法，利用网络蛋白质数据库和各种软件，对辅酶氧化酶系进行分析对比，归纳总结辅酶氧化酶的分类，简要机理及其辅基周围重点氨基酸残基，重点分析烟酰胺型辅酶氧化酶的作用机理，蛋白质序列及其空间立体结构，通过蛋白质序列比对及 3D 结构比对获得活性中心所在位点，希望得到辅酶氧化酶的特征氨基酸序列，利于今后的蛋白质识别，得到活性中心及其辅基周围氨基酸残基，利于今后的酶的定向改造修饰等，也利用构建酶偶联系统进行辅酶的再生。

2. 材料与方法

2.1. 材料来源与工具

酶的序列及结构信息来源于网上共享的生物信息学数据库，如 NCBI, PDB, SWISS-MODEL, SRS, ExPASy, Profile, InterProScan 等。分析软件为 ClustalW 2.0, ClustalX 2.0, PyMOL 1.0, VMD1.8.7 和 Rasmol 2.7。

2.2. 方法

应用 Clustal 序列比对软件对烟酰胺型辅酶氧化酶或脱氢酶的家族下的子集进行蛋白质序列分析，发现特征序列，辨别观察其同源性和保守位点。应用 PyMOL 1.0 和 VMD1.8.7 对获得的酶的空间结构进行分析，利用 Swiss-Model 在线系统分析酶的核心区域的立体结构，用软件 Rasmol 2.7 查看蛋白质的三维结构图。流程如图 1：对 NADH(P)H 辅酶氧化酶的结构识别研究方法流程图。

3. 结果与分析

3.1. 序列比对

通过 ExPASy 的 Enzymes 数据库查得烟酰胺型辅酶氧化酶和脱氢酶都位于国际酶法分类中的 1.6.-.- 这一子集中。除去该子集中没有蛋白序列及空间结构的酶，结果如表 1 所示。

应用 ClustalX 2.0 对 Ec1.6.-.- 下的每个子集的全体蛋白质序列进行全序列比对，得出每个子集中所有蛋白的序列比对图，观察其同源性和保守位点。图 2 是 Ec1.6.99.3 子集中的 NOX 的全序列比对的图(部分)。

本文选取 Ec1.6.99.3 子集为研究对象，Ec1.6.99.3 子集下 NADH 脱氢酶一共有 133 种，其中有 2 种存在 3D 立体结构，存在于大肠杆菌和嗜热杆菌。该子集中包含我们重点研究的 6 种已命名辅酶氧化酶

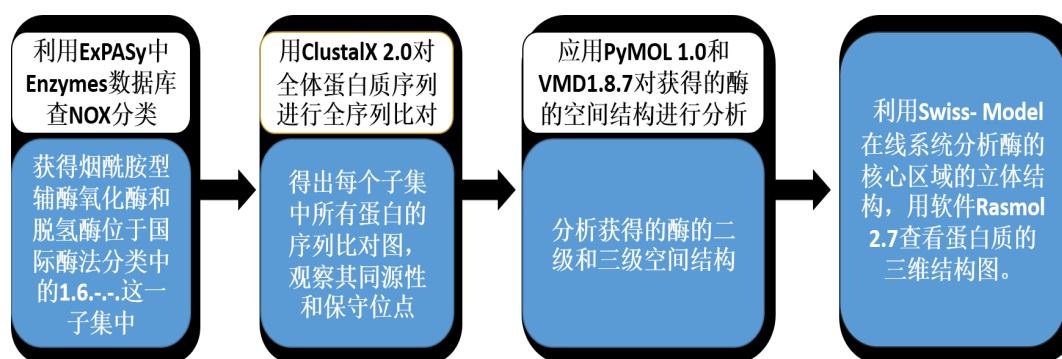


Figure 1. Flow chart of research method of the structure of coenzyme NADH(P)H oxidase identification
图 1. 对 NADH(P)H 辅酶氧化酶的结构识别的研究方法流程图

Table 1. The number and name of enzyme under the subset of the international classification of enzymatic 1.6.-. (last updated on May 19, 2010)
表 1. 国际酶法分类下 1.6.-.子集下酶的编号和名称(2010 年 5 月 19 日最后更新)

国际酶法分类号	英文名称	中文名称
1.6.1.1	NAD(P)(+) transhydrogenase (B-specific)	转移脱氢酶(B)
1.6.1.2	NAD(P)(+) transhydrogenase (AB-specific)	转移脱氢酶(AB)
1.6.2.2	Cytochrome-b5 reductase	细胞色素 B5 还原酶
1.6.2.4	NADPH-hemoprotein reductase	血红素蛋白还原酶
1.6.3.1	NAD(P)H oxidase	烟酰胺型辅酶氧化酶
1.6.5.2	NAD(P)H dehydrogenase (quinone)	NAD(P)H 辅酶脱氢酶(醌型)
1.6.5.3	NADH dehydrogenase (ubiquinone)	NADH 脱氢酶(辅酶 Q 型)
1.6.5.4	Monodehydroascorbate reductase	单体抗坏血酸盐脱氢酶
1.6.5.5	NADPH:quinone reductase	醌型还原酶
1.6.99.1	NADPH dehydrogenase	NADPH 脱氢酶
1.6.99.3	NADH dehydrogenase	NADH 脱氢酶
1.6.99.5	NADH dehydrogenase (quinone)	NADH 脱氢酶(醌接受体)

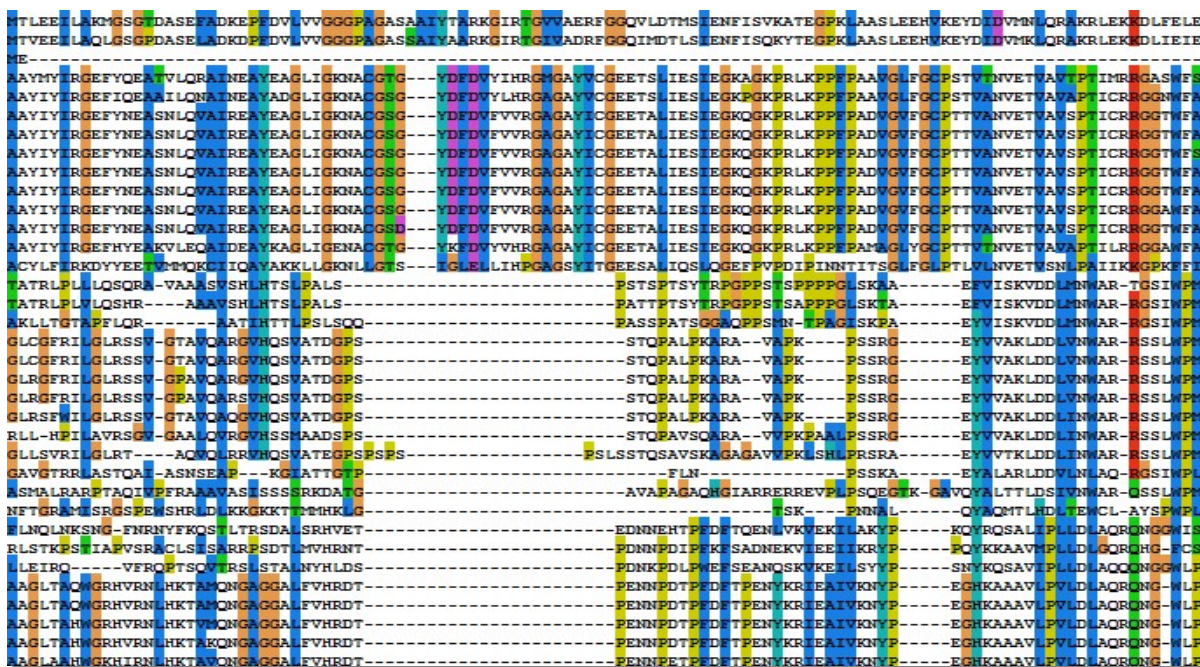


Figure 2. The whole sequence alignment of Ec1.6.99.3 (partial)
图 2. Ec1.6.99.3 的全序列比对(部分)

(NOX), 其中 P37061 和 A2RIB7 为已知型 NADH 氧化酶, 剩下的 Q58065、Q49408、P75389、Q5XC60 均为推断型 NADH 氧化酶。已命名的 6 种 NOX 的序列比对如图 2, 我们发现在 10 位和 42 位氨基酸左右残基高度相似。此外, 我们同样发现每一子集中酶的同源性都很高, 这说明酰胺型辅酶氧化酶或脱氢酶虽然在不同的生物中, 但都催化同一类反应, 有相同的电子接受体(图 3)。

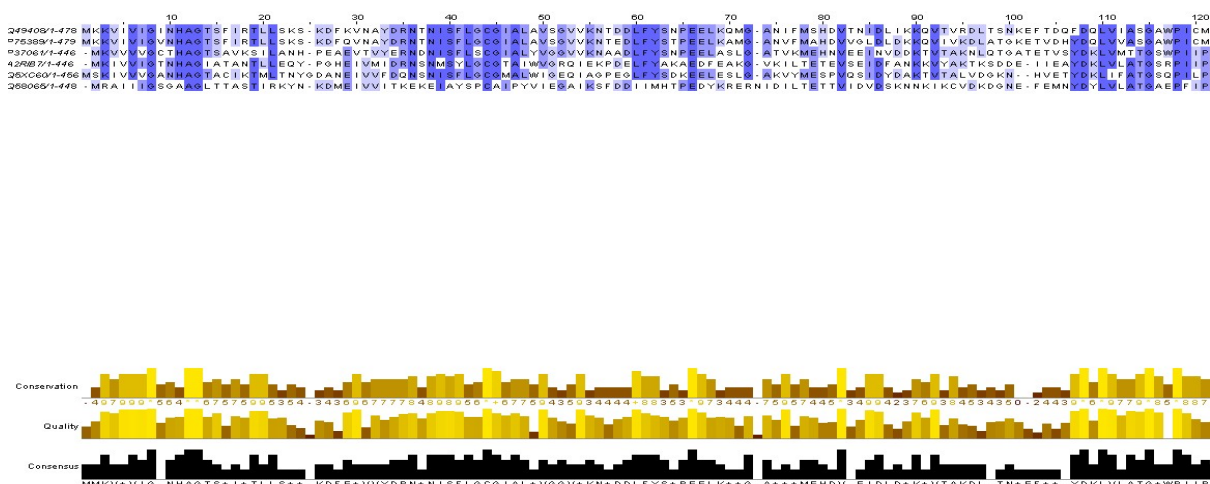


Figure 3. 6 named NOX protein sequence alignment in Ec1.6.99.3

图 3. Ec1.6.99.3 中 6 种已命名的 NOX 蛋白质序列比对

P37061 存在于肠球菌中，全长 446AA，可催化四个电子的氧气的还原反应。P37061 的活性位点在 Cys-42 处，反应中氧化态 Cys-SOH 通过 His-10 的氢键帮助维持稳定。又根据 PDB code: 2cdu 对其 3D 结构进行同源模建的，序列的同源性达 55%，每个亚基都链接一个 ADP 和 FAD 辅基，FAD 辅基以氢键和亚基结合，周围重点残基为 Thr9, His10, Glu32, Csx42, Val81, Asp282, Ala300, ADP 周围重点残基为 Asp179, His181, Tyr188, Val214。

A2RIB7 是存在于乳球菌中的 NADH 氧化酶，全长 446AA，催化分子氧得到四个电子还原成水，可作用于 beta-NADH，不作用于 alpha-NADH, beta-NADPH 或 alpha-NADPH，在有氧的条件下，氧气是电子接受者，在厌氧的条件下，DCIPh 和 MB 可以替代氧作为电子接受者。其 3D 结构是根据 2bc0(PDBcode) 进行同源建模得到的，序列同源度为 49%。辅基为 FAD，周围重点残基为 Asn10, Asp34, Val81, Asp292, Ala310, Phe436。

3.2. 立体结构比对

通过一系列的蛋白质序列比对，我们观察到一个子集下酶的同源性较高，在序列比对过程中，可以看出一些氨基酸残基高度保守的位点，我们推测这些位点可能是酶的活性中心或辅基结合位点。由于每个子集的序列相似度较高，所以选取 Ec1.6.99.3 中存在已知蛋白质立体结构的 2 种已知型酶进行具体研究。先从酶的编号，功能开始，分析它的蛋白质二级结构，通过 PDB 下载其 3D 结构文件，利用 PyMOL 打开，再选取蛋白质亚基进行具体研究。根据之前的蛋白序列比对，选择包含辅基结合位点和活性中心位点的亚基。

图 4、图 5 为 P37061 和 A2RIB7 这两种已知型 NOX 蛋白质二级结构域，比较发现在 10 位点为 NOX 的质子接受点，而 42 位点为其催化活性中心所在，并且在 42 位处紧密连接着一个 FAD 辅基。在明确这两个特殊位点后，又模拟了 P37061 和 A2RIB7 的立体结构(如图 6)，进一步考察这两个位点周围可能包含的蛋白质亚单位，结果显示活性中心周围的氨基酸残基呈现高度保守性，主要包含 Gly43, Leu40 或 Gly43, Ser40 这两类特征残基。为了验证这些位点的普遍性，我们又对两种推断型蛋白质 Q58065、P75389 进行同样的建模分析，结果，此种断型的 NADH 氧化酶活性中心也在 42 或 43 号氨基酸位置，该位置为 Cys 或 Gly，周围出现 Leu40 或 Ser40，所以通过 3D 结构比对可以推断出有这样保守结构的蛋白质序列极有可能是 NAD(P)H 氧化酶。

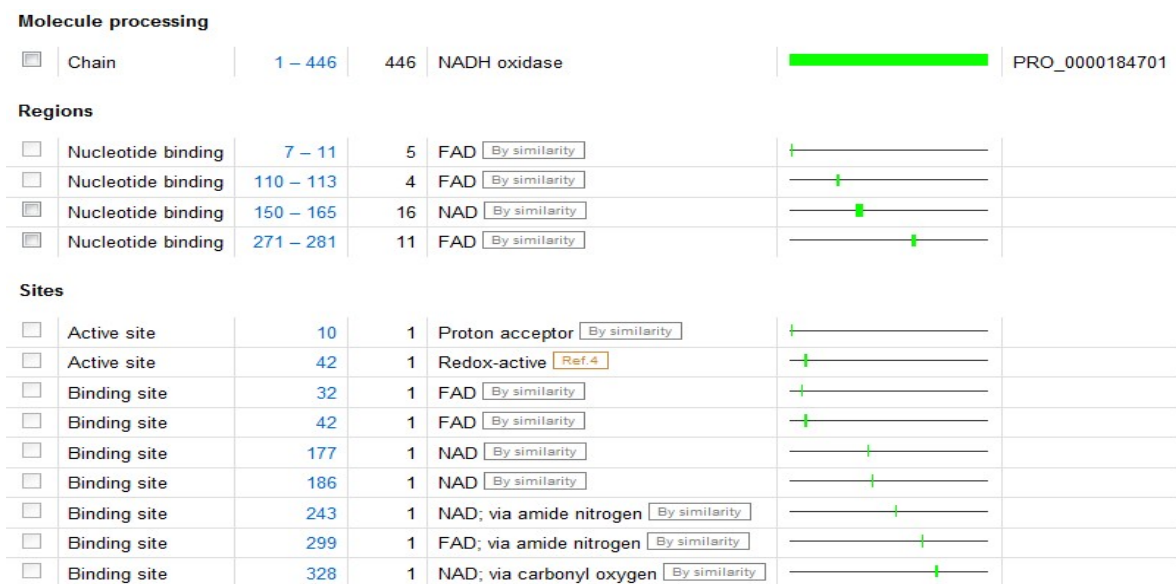


Figure 4. The secondary structure domain of protein P37061 (*E. faecalis*)

图 4. P37061(*E. faecalis*)的蛋白质二级结构域

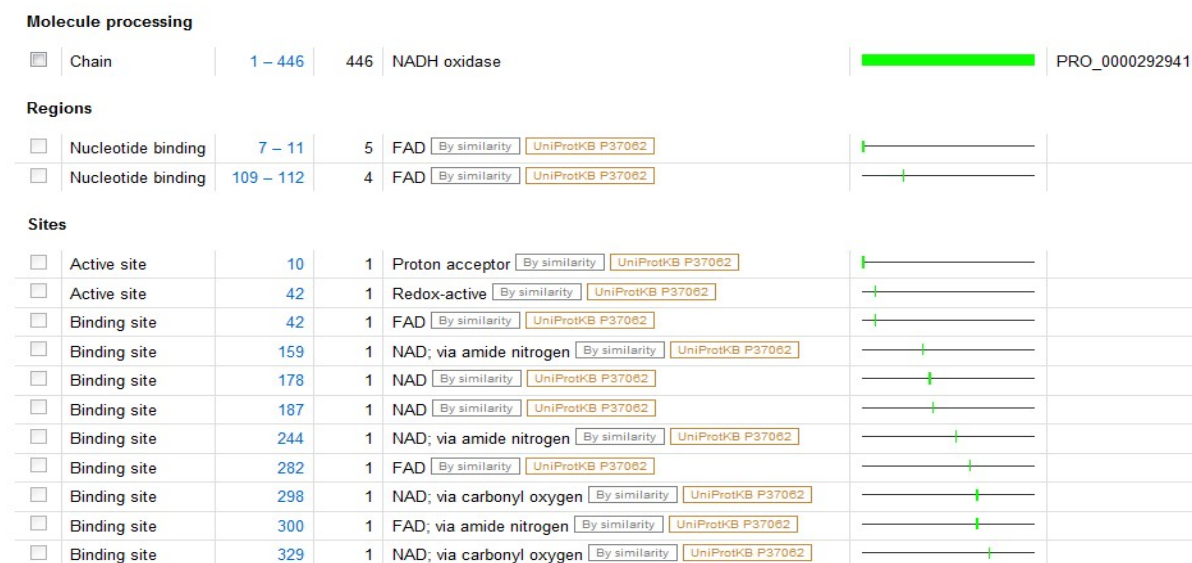


Figure 5. The secondary structure domain of protein A2RIB7 (*L. lactis*)

图 5. A2RIB7(*L. lactis*)的蛋白质二级结构域

3.3. NOX 结构功能域与催化机理

根据产物的不同，NOX 可分为两类：一类产物为 H_2O_2 的，成为 NADH 过氧化酶或 H_2O_2 型 NADH 氧化酶(NOX-1)，在生成 H_2O_2 的过程中发生了 2 个电子的转移[5]。另一类产物为 H_2O 的，就是通常所谓的 NADH 氧化酶(狭义)或 H_2O 型 NADH 氧化酶(NOX-2)，在生成 H_2O 的过程中发生了 4 个电子的转移[6]。

图 7 为辅酶氧化酶的典型结构域，主要分为 NAD(P)H 结合域，FAD 结合域，ADP，FAD 和二聚体域[7]。FAD 依赖型 NADPH 氧化酶可以等量的催化 NADH 或是 NADPH 氧化同时还原氧气生成水，稳态之后只有 0.5% 的还原产物被测定为是过氧化氢，这表明在酶氧化 NADPH 和氧气的反应之后，过氧化氢

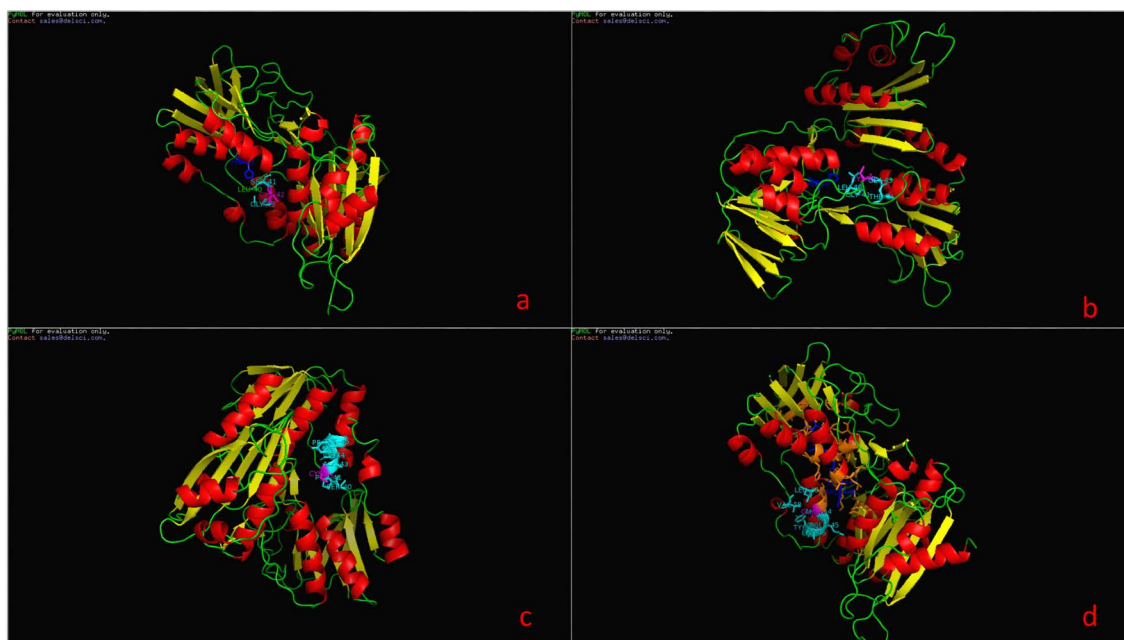


Figure 6. the catalytic center of loci and conservative amino acid residues of (a): P37061(*E. faecalis*), (b): A2RIB7 (*L. lactis*), (c): Q58065(*M. jannaschii*), (d): P75389(*M. pneumoniae*)

图 6. (a): P37061(*E. faecalis*)、(b): A2RIB7(*L. lactis*)、(c): Q58065(*M. jannaschii*)、(d): P75389(*M. pneumoniae*)的催化中心位点及保守氨基酸残基

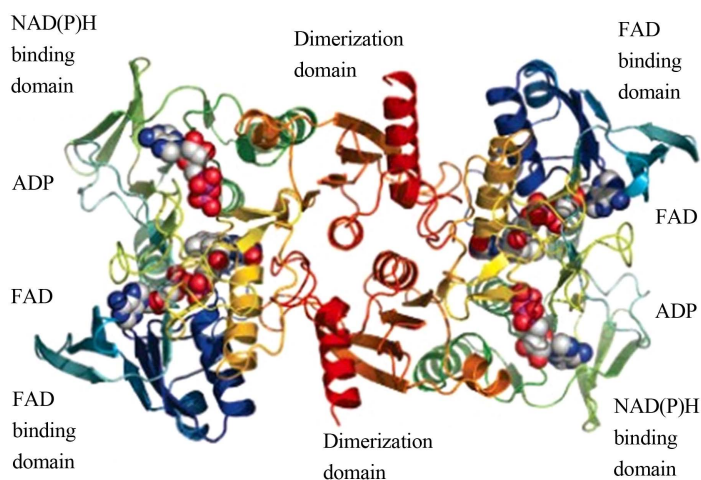


Figure 7. NOX protein molecule function domain (b1) [7]

图 7. NOX 蛋白质分子的功能域[7]

并没有离开这一系统。电子密度显示氧化还原活性中心 Cys42 邻近 FAD 的表面,可以被氧化为次磺酸形式(Cys-SOH)。Cys42 的侧链也显示出两种构型,次磺酸以氢键与 His10 结合,另外一种构象是以氢键和 FAD 的氧原子结合。而且在 NADPH 结合区域还发现结合了辅基 ADP,但它的存在并不影响酶的活性。根据电子密度图我们可以推测每一个 NADH 或 NADPH 底物都通过一条长长的通道从酶的外部一直延伸到 FAD 的内部[7]。

通过上述对 NOX 催化活性中心位点的识别和对空间立体结构的分析,结合有前人对 *L. sanfranciscensis* 中 NOX 的研究[7]可以总结出 NOX 催化中心的反应机理, NAD(P)H 的氧化反应分为两部分,其中

涉及了 FAD 的氧化还原, 氧气被还原为过氧化氢, 进而通过半胱氨酸的变化还原成水, 还有 NAD(P)H 最终氧化成 NAD(P)^+ , 实现了烟酰胺型辅酶的再生。根据立体结构的显示, 催化活性中心处的 Cys42 紧密连接 FAD 辅基, His10 在其附近起电子接受体的作用, 也帮助 Cys42 稳定其磺酸的氧化形式。机理显示, NAD(P)H 反应时先和 FAD 结合, 将其还原释放出一分子的 NAD(P)^+ , 氧气存在的情况下将氧气还原成过氧化氢, Cys42 在过氧化氢还原成水的过程中起了重要作用, 在这过程中它变成次磺酸形式, 之后又通过 FAD 还原为原始形式, 在这次 FAD 的构型变化中 NAD(P)H 又被氧化成 NAD(P)^+ 。

4. 结论

通过利用生物信息学的研究, 对辅酶氧化酶系进行了总结和分类, 了解其基本机理, 先由 Ec1.6.99.3 子集下的 P37061 和 A2RIB7 这两种已知型 NOX 蛋白质序列比对, 二级结构的考察, 比较发现在 10 位点为 NOX 的质子接受点, 而 42 位点为其催化活性中心所在。又对其立体结构的对比和分析, 获得其催化中心的结构, 分析发现活性中心周围的氨基酸残基呈现高度保守性, 主要包含 Gly43, Leu40 或 Gly43, Ser40 这两类特征残基。根据又对两种推断型蛋白质 Q58065、P75389 进行同样的建模分析我们确定此性质具有一定的普遍性。所以通过 3D 结构比对可以预测推断有这样保守结构的蛋白质序列极有可能是 NAD(P)H 氧化酶。这可用于今后指导辅酶氧化酶的筛选, 在分子层面修饰和改造酶的结构。今后的研究也可针对某一种辅酶氧化酶进行同源建模和分子对接, 更能深入了解其作用机理和氨基酸残基对催化活性的影响。

参考文献 (References)

- [1] 吕陈秋, 姜忠义, 王姣 (2004) 烟酰胺型辅酶 NAD(P)^+ 和 NAD(P)H 再生的研究进展. *有机化学*, **11**, 1366-1379.
- [2] 王秋雨, 钦传光, 左小佳, 田林奇 (2009) 伴有辅酶再生的生物催化过程. *化学通报*, **7**, 587-593.
- [3] 张翀, 邢新会 (2004) 辅酶再生体系的研究进展. *生物工程学报*, **6**, 811-816.
- [4] 李卉 (2005) 辅酶 I 的聚乙二醇修饰. 浙江大学, 杭州.
- [5] Toomey, D. and Mayhew, S.G. (1998) Purification and characterization of NADH oxidase from *Thermus aquaticus* YT-1 and evidence that it functions in peroxide-reduction system. *European Journal of Biochemistry*, **251**, 935-945.
- [6] Masako, H., Yuji, Y. and Yoahiyuki, K. (2000) Molecular biology of oxygen tolerance in lactic acid bacteria: Functions of NADH oxidases. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **90**, 484-493.
- [7] Lountos, G. T., Jiang, R.R. William, B., et al. (2006) The crystal structure of NAD(P)H Oxidase from *Lactobacillus sanfranciscensis*: Insights into the conversion of O_2 into two water molecules by the flavoenzyme. *Biochemistry*, **45**, 9648-9659.