DOI:10.12441/spyswjs.20240116003 [文章编号] 1673-1689(2025)04-0063-09

半理性设计转甲基酶以解除*L*-刺桐碱的反馈抑制

王梦琪[1,2] 徐建中[1,2*]

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

摘要:【目的】在大肠杆菌(*Escherichia coli*,*E. coli*)中改造*S*-腺苷甲硫氨酸(SAM)依赖型转甲基酶,解除产物*L*-刺桐碱对该酶的反馈抑制,从而提高*L*-刺桐碱产量。**【方法】**以大肠杆菌BL21(DE3)为底盘细胞,外源诱导表达SAM依赖型转甲基酶$EgtD_{M252V, E282A}$(简称MsE,编码基因*egtD*),并通过优化诱导温度和诱导剂浓度提高其可溶性表达。研究中发现,当*L*-刺桐碱积累到一定质量浓度时,酶活性会受到反馈抑制,导致催化效率下降。为解决这一问题,采用蛋白质工程策略,利用Schrodinger分子对接软件和PyMOL结构分析软件对MsE的底物结合口袋及通道进行模拟,筛选潜在突变位点并进行丙氨酸(Ala)扫描。**【结果】**将143位的谷氨酸(Glu)突变为Ala(E143A)能显著减弱产物抑制效应,并增强该酶对*L*-色氨酸的催化能力。在添加100 mg/L *L*-刺桐碱的条件下,突变体MsE_{E143A}的产物抑制作用明显降低,最终使重组菌株*E. coli* BL21(DE3)/pET-MsE_{E143A}的*L*-刺桐碱产量达到(10.85±0.26) mg/L,比出发菌株提升了175%。**【结论】**通过半理性设计成功改造MsE,不仅解决了产物反馈抑制问题,还为利用蛋白质工程强化*L*-刺桐碱的生物合成提供了有效策略。

关键词:*L*-刺桐碱;大肠杆菌;色氨酸特异性转甲基酶;蛋白质工程

Semi-rational Design of Methyltransferase Relieves the Feedback Inhibition of *L*-Hypaphorine

WANG Mengqi[1,2] *XU Jianzhong*[1,2*]

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] This study modified the *S*-adenosylmethionine (SAM)-dependent methyltransferase to relieve the feedback inhibition of the product *L*-hypaphorine on this enzyme in *Escherichia coli* (*E. coli*), thereby enhancing *L*-hypaphorine production. [**Method**] *E. coli* BL21(DE3) was used as the chassis strain, and the expression of the SAM-dependent methyltransferase $EgtD_{M252V, E282A}$ (abbreviated as MsE, the encoding gene is *egtD*) was exogenously induced. The induction temperature and inducer concentration were optimized to enhance the soluble expression. It was observed that the enzyme activity suffered feedback inhibition when *L*-hypaphorine accumulated to a threshold mass concentration, which led to reduced catalytic efficiency. To address this problem, a protein engineering strategy was employed. Using Schrodinger (a molecular docking software) and PyMOL (a structural analysis software), the substrate-binding pocket and channels of MsE were simulated to screen potential mutation sites and perform alanine scanning. [**Result**] Glutamate-to-alanine mutation at position 143 (E143A) significantly attenuated product inhibition and enhanced the enzyme's catalytic capacity toward *L*-tryptophan. Under supplementation with 100 mg/L *L*-hypaphorine, the mutant MsE_{E143A} exhibited markedly reduced inhibition. Consequently, the *L*-hypaphorine yield of the recombinant strain *E. coli* BL21(DE3)/pET-MsE_{E143A} reached (10.85±0.26) mg/L, representing a 175% increase compared to that of the parental strain. [**Conclusion**] This study

基金项目:国家自然科学基金面上项目(32271534)。

通信作者:徐建中(1984—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事微生物代谢改造研究。E-mail: xujianzhong@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2024-01-16 **修回日期:**2024-03-11

successfully engineered MsE through semi-rational design, not only resolving the feedback inhibition but also providing an effective strategy for enhancing *L*-hypaphorine biosynthesis *via* protein engineering.

Keywords: *L*-hypaphorine; *Escherichia coli*; tryptophan-specific methyltransferase; protein engineering

L-刺桐碱，又被称为*N*，*N*，*N*-三甲基-*L*-色氨酸、云甘定，是一种在刺桐属植物中发现的天然吲哚生物碱。其结构为在*L*-色氨酸的α-NH_2的N位置上迭代加上3个甲基，因此，它可以在甲基转移酶的作用下，以*L*-色氨酸为底物，由SAM提供甲基，迭代进行3次甲基化而形成。研究发现，*L*-刺桐碱有很多的药用价值，能够改善胰岛素敏感性和减轻肥胖，具有抗高血糖、抗炎功能[1-4]。它还能通过影响肌动蛋白组织并抑制吲哚-3-乙酸，对癌症治疗具有潜在意义[5]。其次，它能够显著延长非快速眼动睡眠时间，对小鼠的睡眠具有促进作用[6]。除此之外，它还对中枢神经系统和认知功能有影响，能够抑制小脑中的乙酰胆碱酯酶（AchE）活性，作用区域在小脑，且并未观察到对正常人体细胞存在毒害作用，可用于治疗阿尔茨海默症[7]。鉴于*L*-刺桐碱在促进消炎、睡眠和认知方面的医疗作用，其在临床应用和制剂开发方面具有较大的潜力。

虽然*L*-刺桐碱具有极高的药用价值，但目前它的生产主要依赖植物提取和化学合成。植物提取方法主要有炮制法、乙醇浸渍法等，但植物的生长受地理位置、气候环境的影响较大。2015年版《中国药典》（一部）收载的王不留行的炮制法为清炒法，在此方法基础上，曹斯琼等[8]成功建立了王不留行生品及其炮制品的UPLC指纹图谱，且王不留行炒制前后的化学成分一致性较好，但是炒制后*L*-刺桐碱的含量并不高。乙醇浸渍法是一种常见的中药提取法。戚梦婷等[9]选择含油量较低的生王不留行，在室温下通过乙醇浸渍法提取*L*-刺桐碱，并通过单因素和正交试验考察不同料液比、时间和乙醇体积分数对乙醇浸渍提取生王不留行中*L*-刺桐碱含量的影响，最终得出当生王不留行种子和体积分数75%的乙醇以1∶14的料液比提取4 d，提取效果最好，最终提取量达到了1.22 mg/g；该法工艺简单，结果稳定，但提取率较低，不能满足工业生产需要。邱贺媛等[10]建立了鸡骨草中微波辅助提取-高效液相色谱分析方法，经过优化后最终得到最佳的微波辅助提取条件；其研究表明，不同地区的鸡骨草中刺桐碱的含量并不相同，表明提取率受到植物生长情况的影响。化学合成法虽然可以合成*L*-刺桐碱[11]，但存在工艺复杂、条件苛刻、副产物多且对环境有污染等缺点。目前，很少有利用微生物进行*L*-刺桐碱合成的报道。微生物具有体积小、繁殖快、环保无污染和重复率高的优点，利用其生产高附加价值产品逐渐成为主流[12]。

转甲基酶根据结构的不同被分为5类。大多数已知的转甲基酶都是I类折叠，有7条β链和2个α螺旋，包含2个结合口袋——基本相同的SAM结合口袋和特异性的底物结合口袋[13]。SAM是一种具有生物活性的含硫氨基酸，是几乎所有生物中都能发现的反式甲基化反应的重要甲基供体之一，也是生物合成氨基丙基的前体物质[14-15]。SAM依赖型转甲基酶在多种细胞代谢过程中发挥着重要作用，如代谢调控、信号传导等；这些酶将SAM上的一个甲基转移到各种受体分子上，使底物甲基化[13]。来源于*Mycolicibacterium smegmatis*的EgtD是SAM依赖型组氨酸*N*，*N*，*N*-甲基转移酶，具有I类折叠，是首个被发现可以将游离的氨基酸甲基化为相应甜菜碱的甲基转移酶[16]。Vit等[16]通过对EgtD进行定点突变，将252位的蛋氨酸（Met）突变为缬氨酸（Val）、282位的Glu突变为Ala，EgtD的底物识别从*L*-组氨酸变为了*L*-色氨酸，这为利用微生物合成*L*-刺桐碱提供了可能。作者经前期研究，利用突变体MsE已经实现了利用微生物从头生物合成*L*-刺桐碱，然而研究中发现，产物积累到一定程度时，对酶有很强的反馈抑制。如何解除*L*-刺桐碱对SAM依赖型转甲基酶MsE的反馈抑制作用对进一步提升*L*-刺桐碱产量具有重要意义。随着基因工程技术的日渐成熟，研究者开始通过定向进化在分子水平上改造目的蛋白质编码基因，进而筛选某方面性能有明显提升的突变体。例如，Zhang等[17]通过过表达*ilvBN*基因，并将47位异亮氨酸定点突变为酪氨酸，从而减弱反馈抑制，最终使重组菌株的*L*-异亮氨酸质量浓度达到了32.1 g/L。刘宁等[18]通过对谷

氨酸棒状杆菌中乙酰羟酸合成酶AHAS的调节亚基进行定点突变，筛选到一个单突变体，使酶活力提高了41%，摇瓶发酵的产量比出发菌株的产量提高了51%，提高了丙酮酸流向*L*-亮氨酸的代谢通量。

在本次研究中，作者将外源蛋白质在大肠杆菌内表达，分别从温度和诱导剂浓度两方面进行可溶性表达的优化。前期在以大肠杆菌为出发菌株、采用摇瓶发酵法生成*L*-刺桐碱时发现，当产物质量浓度达到100 mg/L时，产物产量不再增加。因此，作者利用蛋白质分析软件以及分子改造手段，对蛋白质进行改造，寻找、预测合适的突变位点，以期通过半理性设计减弱*L*-刺桐碱的反馈抑制，从而提高*L*-刺桐碱产量。

1　材料与方法

1.1　菌株、质粒与培养基

选用*E. coli* BL21（DE3）作为表达宿主，表达来源于*Mycolicibacterium smegmatis*的含有M252V、E282A两个突变位点的转甲基酶MsE（$EgtD_{M252V, E282A}$，Genbank登录号为OMH61674），由苏州金唯智生物科技有限公司根据大肠杆菌的密码子偏好性进行优化并合成。选择*E.coli* JM109用于质粒构建，选用pET28a质粒进行蛋白质表达。本研究中用到的菌株和质粒见表1，用到的引物见表2。LB培养基：胰蛋白胨10 g/L、酵母提取物5 g/L、NaCl 10 g/L。TB培养基：胰蛋白胨12 g/L、酵母提取物24 g/L、甘油4 g/L、K_2HPO_4 16.42 g/L、KH_2PO_4 2.31 g/L。

1.2　主要试剂、抗体及仪器

质粒提取试剂盒、纯化试剂盒、*Taq* DNA聚合酶、2×Phanta Max Master Mix、DNA连接酶、异丙基*β-D*-硫代半乳糖苷（IPTG）、卡那霉素：南京诺唯赞生物科技股份有限公司；*L*-刺桐碱：成都德思特生物技术有限公司；SAM、*L*-色氨酸：上海阿拉丁生化科技股份有限公司；*S*-腺苷高半胱氨酸水解酶（SAHH）：湖北新德晟材料科技有限公司。

LongGene PCR扩增仪：A300型，杭州朗基科学仪器有限公司；可见光分光光度计：UV2100型，上海尤尼柯仪器有限公司；高速离心机：G1-14型，美国Sigma公司；高效液相色谱仪：1290 II型，美国安捷伦科技有限公司。

表1　本研究中用到的菌株和质粒

Table 1　Strains and plasmids used in this study

	主要菌株和质粒名称	相关特征	来源
菌株	*E. coli* JM109	用于质粒构建	作者所在实验室保藏
	E. coli BL21（DE3）	用于蛋白质表达	作者所在实验室保藏
	E. coli BL21/pET-28a	菌株*E. coli* BL21（DE3）携带空载质粒pET-28a	本研究构建
	E. coli BL21/pET-MsE	菌株*E. coli* BL21（DE3）携带质粒pET-28a-MsE	本研究构建
	E. coli BL21/pET-MsE_{P35A}	菌株*E. coli* BL21（DE3）携带质粒pET-28a-MsE_{P35A}	本研究构建
	E. coli BL21/pET-MsE_{K36A}	菌株*E. coli* BL21（DE3）携带质粒pET-28a-MsE_{K36A}	本研究构建
	E. coli BL21/pET-MsE_{F38A}	菌株*E. coli* BL21（DE3）携带质粒pET-28a-MsE_{F38A}	本研究构建
	E. coli BL21/pET-MsE_{Y39A}	菌株*E. coli* BL21（DE3）携带质粒pET-28a-MsE_{Y39A}	本研究构建
	E. coli BL21/pET-MsE_{F47A}	菌株*E. coli* BL21（DE3）携带质粒pET-28a-MsE_{F47A}	本研究构建
	E. coli BL21/pET-MsE_{Y56A}	菌株*E. coli* BL21（DE3）携带质粒pET-28a-MsE_{Y56A}	本研究构建
	E. coli BL21/pET-MsE_{E143A}	菌株*E. coli* BL21（DE3）携带质粒pET-28a-MsE_{E143A}	本研究构建
	E. coli BL21/pET-MsE_{L167A}	菌株*E. coli* BL21（DE3）携带质粒pET-28a-MsE_{L167A}	本研究构建
质粒	pET-28a	表达质粒，T7启动子	作者所在实验室保藏
	pET-28a-MsE	pET-28a携带M252V，E282A突变的基因*egtD*	本研究构建
	pET-28a-MsE_{P35A}	pET-28a携带突变体MsE_{P35A}的基因	本研究构建
	pET-28a-MsE_{K36A}	pET-28a携带突变体MsE_{K36A}的基因	本研究构建
	pET-28a-MsE_{F38A}	pET-28a携带突变体MsE_{F38A}的基因	本研究构建
	pET-28a-MsE_{Y39A}	pET-28a携带突变体MsE_{Y39A}的基因	本研究构建
	pET-28a-MsE_{F47A}	pET-28a携带突变体MsE_{F47A}的基因	本研究构建
	pET-28a-MsE_{Y56A}	pET-28a携带突变体MsE_{Y56A}的基因	本研究构建
	pET-28a-MsE_{E143A}	pET-28a携带突变体MsE_{E143A}的基因	本研究构建
	pET-28a-MsE_{L167A}	pET-28a携带突变体MsE_{L167A}的基因	本研究构建

表 2 本研究中用到的引物

Table 2 Primers used in this study

主要引物	序列（5′—3′）
MsE_{P35A}-F	CCTGCCGGCGAAATGGTTTTATGATGCGGTGG
MsE_{P35A}-R	CATTTCGCCGGCAGGCTTTTCGG
MsE_{K36A}-F	GCCGGCGTGGTTTTATGATGCGGTGGGC
MsE_{K36A}-R	TAAAACCACGCCGGCGGCAGGCTTTTC
MsE_{F38A}-F	TGGGCGTATGATGCGGTGGGCAG
MsE_{F38A}-R	CGCATCATACGCCCATTTCGGCGGCAG
MsE_{Y39A}-F	AATGGTTTGCGGATGCGGTGGGCAGC
MsE_{Y39A}-R	GCATCCGCAAACCATTTCGGCGGCAG
MsE_{F47A}-F	GATCTGGCGGATCAGATTACCCGCCTG
MsE_{F47A}-R	CTGATCCGCCAGATCGCTGCCCAC
MsE_{Y56A}-F	TGCCGGAAGCGTATCCGACCCGCACCGAAGC
MsE_{Y56A}-R	GATACGCTTCCGGCAGGCGGGT
MsE_{E143A}-F	GATTTTGCGGAACATCTGGGCAAAATTCC
MsE_{E143A}-R	ATGTTCCGCAAAATCGCCGCACAC
MsE_{L167A}-F	ATTGGCAACGCGACCCCGGCGCCGCGC
MsE_{L167A}-R	GGTCGCGTTGCCAATGGTGCTGCCCAGAAACACCACC

1.3 研究方法

1.3.1 重组表达载体的构建

以 pET28a-MsE 为模板，设计突变引物，通过全质粒 PCR 进行 DNA 扩增，获得带有突变碱基的线性化载体，采用转化的方式导入 *E. coli* JM109 中，涂布到带有卡那霉素抗性的 LB 固体培养基上筛选并进行菌落 PCR 试验，通过核酸电泳进行验证。对在电泳中显示正确条带的单菌落进行扩增培养，提取质粒送到苏州金唯智生物科技有限公司进行测序，对测序结果表明突变成功的菌株进行保藏。全质粒 PCR 反应体系如下：20.0 μL ddH_2O、25.0 μL 2×Phanta Max Master Mix、2×2.0 μL 上下游引物、0.5 μL 模板。

1.3.2 重组酶的表达与优化

重组菌经平板活化后，接种于含有终质量浓度 10 μg/mL 卡那霉素的 10 mL LB 液体培养基中，37 ℃、100 r/min 培养 10~12 h，按 1% 的体积分数接种于含有 10 μg/mL 卡那霉素的 50 mL TB 液体培养基中，37 ℃、100 r/min 进行培养。当菌液 OD_{600} 值达到 0.5~0.6 时，加入终浓度 0.1 mmol/L 的 IPTG，置于 30 ℃、100 r/min 的摇床中诱导表达 16 h。诱导结束后，使用高速离心机于 6 000 r/min 离心 5 min 后收集沉淀，并用 PBS 缓冲液洗涤 2 次。最后加入定量的 PBS 缓冲液悬浮菌体，使用紫外分光光度计测定菌体浓度并调节至一致，利用超声破碎仪在低温下进行 15~20 min 细胞破碎，直至菌液透亮。收集离心后的上清液，即得到粗酶液。

最适诱导温度测定：对外源蛋白质进行不同温度诱导，以期提高其可溶性表达，在控制其他条件一致的情况下，设置 25、30、35 ℃这 3 个温度梯度进行比较，诱导结束后，收集上清液进行 SDS-PAGE 分析。

最适诱导剂浓度测定：在最适温度的诱导条件下，设置终浓度为 0.1、0.5、1.0 mmol/L 的 IPTG，诱导结束后，收集上清液进行 SDA-PAGE 分析。

1.3.3 酶活力测定与酶催化反应

酶活力测定体系：200 μL 反应液里包含了 Tris-HCl 50 mmol/L（pH 7.0）、NaCl 50 mmol/L、$MnBr_2$ 100 μmol/L、SAM 150 μmol/L、SAHH 10 μmol/L、*L*-色氨酸 50 μmol/L 和 100 μL 粗酶液，35 ℃下反应并在 265 nm 条件下监测 10 min。酶活力单位（U）定义为在上述反应条件下每分钟消耗 1 μmol *L*-色氨酸所需的酶量。

酶催化反应体系：200 μL 反应液里包含了 Tris-HCl 50 mmol/L（pH 7.0）、SAM 1.5 mmol/L、SAHH 1.5 mmol/L、*L*-色氨酸 500 mmol/L 和 100 μL 粗酶液，于 35 ℃反应 2 h。反应结束后，采用高效液相色谱测定 *L*-刺桐碱的质量浓度。

产物对酶的抑制作用：酶催化反应体系不变的情况下，分别加入不同质量浓度（50、100、150、200 mg/L）的*L*-刺桐碱，测定产物对酶的抑制情况。对照组不加入产物，每组做3次平行试验。

1.3.4　酶反应条件优化

最适反应温度的测定：控制酶催化反应pH一致，设置温度梯度为20、25、30、35、40 ℃，将粗酶液加入已预热的酶活力测定体系和酶催化反应体系，计算不同温度下突变体的酶活力以及*L*-刺桐碱产量。

最适反应pH测定：控制反应温度为最适温度，分别设置不同pH梯度的缓冲液：磷酸氢二钠-柠檬酸盐缓冲液（pH 6.0），Tris-HCl缓冲液（pH 7.0~9.0），甘氨酸-氢氧化钠缓冲液（pH 10.0）。计算不同pH下粗酶液的酶活力，同时进行酶催化反应；计算不同pH下突变体的酶活力以及*L*-刺桐碱产量。

1.3.5　突变点预测

从PDB数据库中得到MsE的三维结构模型文件（PDB ID：4PIP）。使用蛋白质分析软件Schrodinger、PyMOL进行分子对接以及结构分析，通过底物与酶周围的结合作用力以及观察通道周围的残基结构来进行突变位点的预测。

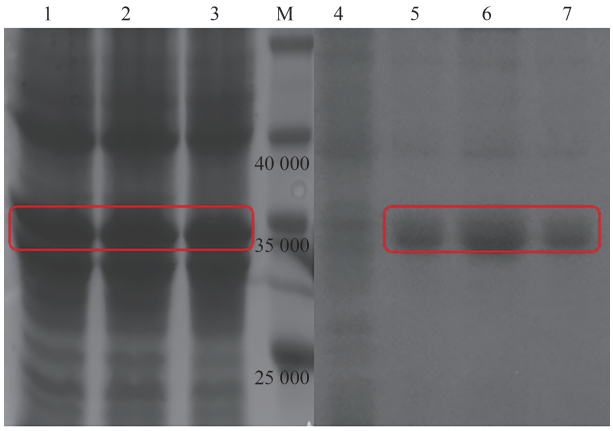
1.3.6　高效液相色谱测定方法

L-刺桐碱通过高效液相色谱进行测定。色谱柱为Waters XBridge Amide C18（4.6 mm×250 mm×5 μm），流量为1 mL/min，柱温为35 ℃，VWD检测器的检测波长为280 nm，梯度洗脱的流动相为纯水和纯乙腈，线性梯度为：0~5 min，纯水体积分数95%；5~15 min，纯水体积分数40%；15~20 min，纯水体积分数95%；20~24 min，纯水体积分数95%。同时检测不同质量浓度梯度的标准品，依据峰面积计算标准曲线。

2　结果与讨论

2.1　诱导条件优化

作者经前期研究发现，外源蛋白质MsE在大肠杆菌中可以正常表达，但其上清液中的可溶性表达较少，沉淀中的包涵体并不能发挥生物活性。因此，通过对其培养条件进行优化，在不同温度和不同浓度IPTG诱导表达后进行SDS-PAGE分析，结果如图1所示。SDS-PAGE表明，当诱导温度为30 ℃时，MsE在上清液中的可溶性表达最高，而大肠杆菌的最适生长温度为37 ℃，说明降低温度会促进蛋白质三级结构的正确折叠。而不同浓度的IPTG对蛋白质的可溶性表达影响较小，但较高浓度的诱导剂会对细胞产生毒害作用。因此，后续选择0.1 mmol/L的IPTG进行研究。



1—0.1 mmol/L IPTG诱导后上清液；
2—0.5 mmol/L IPTG诱导后上清液；
3—1.0 mmol/L IPTG诱导后上清液；M—蛋白质标品；
4—BL21-pET28a对照；5—25 ℃诱导后上清液；
6—30 ℃诱导后上清液；7—35 ℃诱导后上清液。

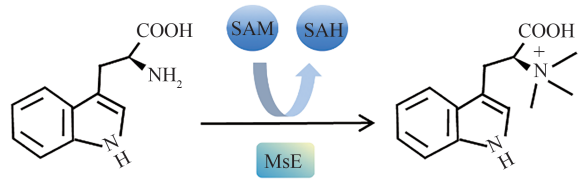
图1　温度和诱导剂浓度优化的SDS-PAGE分析

Fig. 1　SDS-PAGE analysis of temperature and inducer concentration optimization

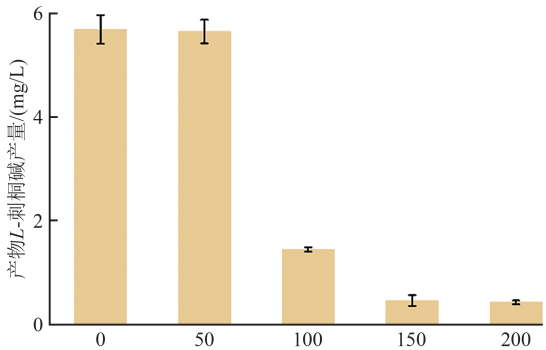
2.2　突变位点筛选

L-色氨酸在转甲基酶的作用下，通过在α-NH_2的N位置上迭代加上3个甲基，即得到*L*-刺桐碱，反应式如图2（a）所示。其中，转甲基酶的酶活力无疑决定了*L*-刺桐碱的产量。EgtD是SAM依赖型甲基转移酶，属于Methylation-33家族，识别*L*-组氨酸为底物，252和282位点经过突变后，该酶已证实可以以*L*-色氨酸为底物[19]。在作者所在课题组的前期研究中，对不同来源的转甲基酶进行了筛选。筛选得到的MsE生物催化后的反应液经处理后，进行高效液相色谱分析时可以检测到产物色谱峰。然而，在研究过程中作者发现，当加入100 mg/L *L*-刺桐碱时，转甲基酶MsE的酶活力会受到抑制，产物*L*-刺桐碱几乎不增长，如图2（b）所示，这无疑会影响后续的扩大生产。

作者通过分子对接软件Schrodinger将*L*-色氨酸、*L*-刺桐碱分别与MsE进行分子对接，然后将对接结构导入PyMOL进行分析，结果如图3（a）~（b）所示。对接之后发现，*L*-色氨酸与酶的氢键作用位点有5个，分别为56Tyr、161Gly、



(a) *L*-刺桐碱的生物合成途径



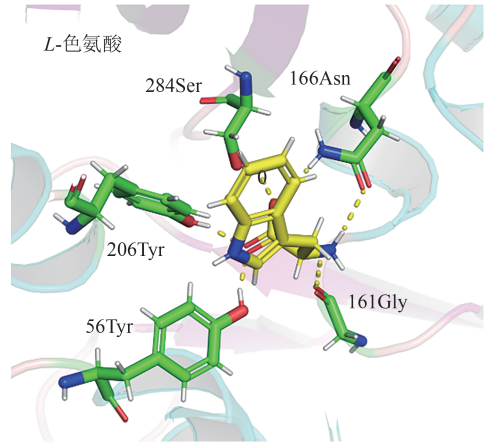
(b) *L*-刺桐碱质量浓度对酶的抑制情况

图 2 *L*-刺桐碱的生物合成途径及产物抑制情况

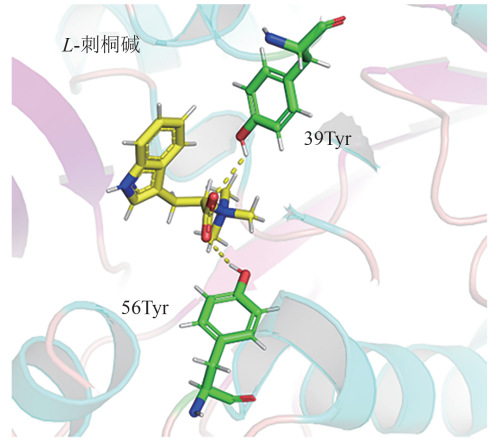
Fig. 2 Biosynthetic pathway and product inhibition of *L*-hypaphorine

166Asn、206Tyr、284Ser；π-π 键有 3 个，与 206Tyr 形成 1 个，与 216Phe 形成 2 个（图中未展现）。*L*-刺桐碱与酶的作用力随着甲基的增多逐渐减弱，氢键作用位点有 2 个，分别为 56Tyr、39Tyr；π-π 键有 1 个，为 38Phe（图中未展现）。与底物相比，产物与酶的结合出现了与新的氨基酸残基的作用力。推测这或许导致产物与酶结合后不易释放，从而占据底物与酶的结合口袋。除此之外，在通道附近，观察到有较大的氨基酸侧链基团，如 35Pro、36Lys、47Phe、143Glu、167Leu。而酶的底物通道入口往往决定着酶的底物选择性、催化活性和稳定性。这些位点的残基在通道内产生了一定的位阻，这可能会影响产物的及时释放。最终，作者选择对 35Pro、36Lys、38Phe、39Tyr、47Phe、56Tyr、143Glu、167Leu 这些位点进行 Ala 扫描，并测定突变酶催化 *L*-色氨酸的酶活力和 *L*-刺桐碱的产量。

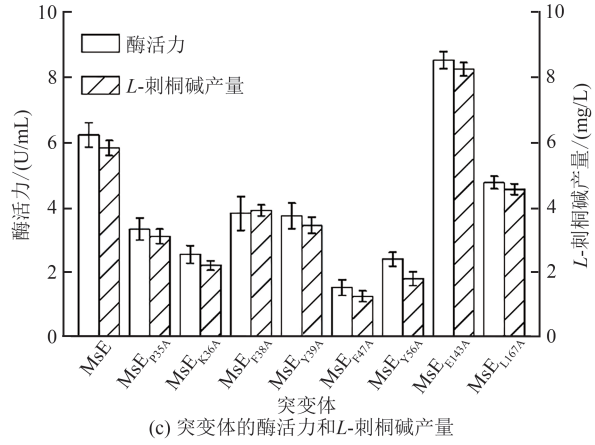
突变体酶活力测定结果如图 3（c）所示，可以看出，对比出发菌株，突变体 MsE_{F47A}、MsE_{Y56A} 的酶活力剧烈下降，说明这些位点可能是保守的氨基酸残基，对 *L*-色氨酸底物结合口袋比较重要。除此之外，筛选到一个正向位点——143 位。突变体 MsE_{E143A} 的酶活力和 *L*-刺桐碱产量相较于出发菌株都得到了提升，分别是出发菌株酶活力和 *L*-刺桐碱产量的 1.37 倍和 1.42 倍。下一步对 143 位进行饱和突变，以探究酶活力是否有进一步提升。



(a) *L*-色氨酸与酶的作用情况



(b) *L*-刺桐碱与酶的作用情况



(c) 突变体的酶活力和*L*-刺桐碱产量

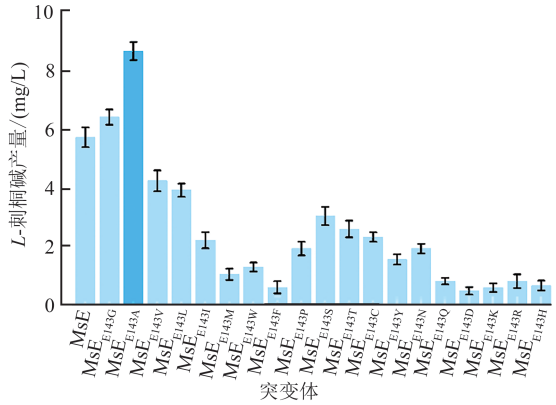
图 3 酶和底物的作用力及突变体产量分析

Fig. 3 Substrate-enzyme interaction and yield analysis of mutants

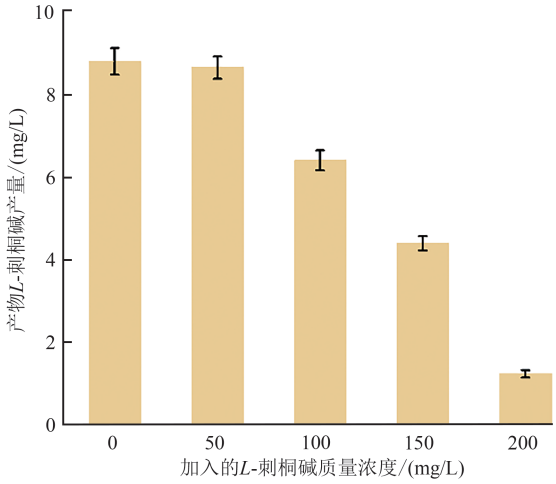
2.3 饱和突变与反馈抑制分析

利用 PCR 技术，对 143 位进行定点饱和突变，

结果如图4(a)所示，依然是在突变为侧链较小的Ala(E143A)时*L*-刺桐碱的产量最高，达到8.63 mg/L。为了探究该突变对解除反馈抑制有无影响，进行了反馈抑制酶催化试验，结果如图4(b)所示。当反应体系中添加100 mg/L的*L*-刺桐碱时，催化反应没有停止，而是继续进行，虽然相比于50 mg/L时，对酶的催化作用显现出抑制效果，但一直到200 mg/L时，抑制作用才明显加强。相较于出发菌株，产物的反馈抑制已得到了明显减弱。



(a) 不同突变体的*L*-刺桐碱产量



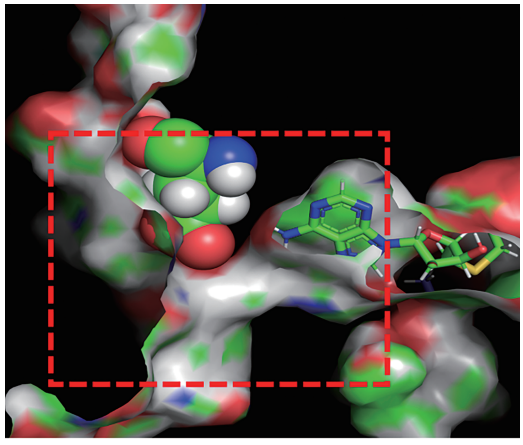
(b) *L*-刺桐碱质量浓度对MsE$_{E143A}$的抑制情况

图4　143位饱和突变后产物产量及MsE$_{E143A}$的产物抑制情况分析

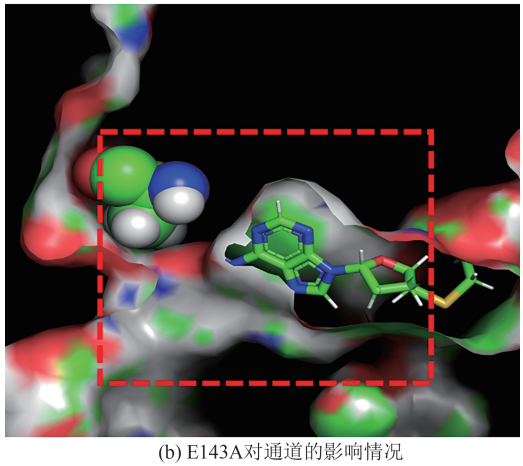
Fig. 4　Analysis of the product yield after saturation mutagenesis at position 143 and the product inhibition of MsE$_{E143A}$

2.4　突变体结构分析

通过上述筛选，得到了一个最佳突变体MsE$_{E143A}$，该突变体不仅提高了酶活力，更减弱了产物的反馈抑制。为了进一步探究其减弱抑制的原因，作者利用蛋白质分子软件对其进行结构解析。利用Schrodinger将突变后的酶与底物和SAM进行对接，并与出发菌株比较，分析结果如图5所示。由图5(a)可知，在底物通道入口处，143位Glu的侧链基团较大，导致通道入口狭窄处产生严重的空间位阻。而随着酶催化反应的进行，底物*L*-色氨酸逐渐加上甲基，分子结构逐渐复杂，所需要的空间变大，对通道进出口的半径也会有一定的要求。因此，较大的Glu可能因为产生的空间位阻大，进而影响了酶的催化活力。如图5(b)所示，当残基E143被突变为具有更小侧链的Ala，减少了氨基酸残基侧链对底物进入结合口袋时的空间位阻，有更通畅的通道使*L*-刺桐碱及时排出，不会积累在活性口袋内占据空间，这不仅减弱了产物的反馈抑制，酶活力相比于出发菌株也提高了1.37倍。



(a) E143对通道的影响情况



(b) E143A对通道的影响情况

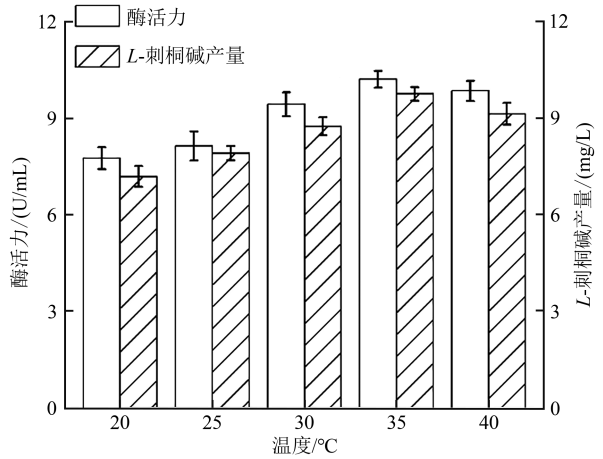
图5　残基在突变前后对底物通道的作用情况

Fig. 5　Effects of residues on substrate channels before and after mutation

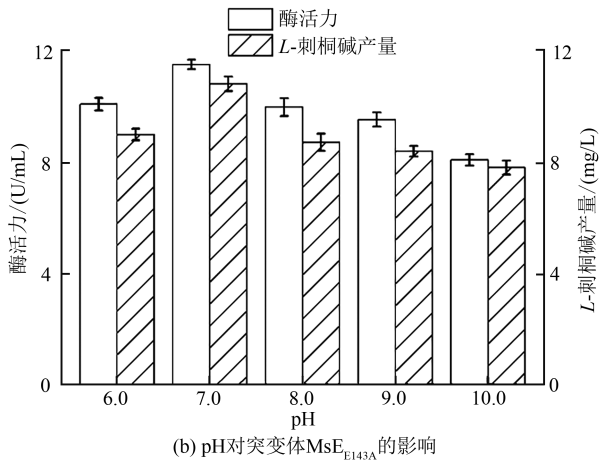
2.5　酶反应条件分析

根据1.3.4中的方法对突变体MsE$_{E143A}$进行酶学性质分析，结果如图6所示。酶的最适温度如

图 6(a)所示，当温度为 20~35 ℃时，酶活力和 *L*-刺桐碱产量随着温度升高而不断增高；温度继续升高到 40 ℃时，酶活力和 *L*-刺桐碱产量开始降低。因此，突变体 MsE_{E143A} 的最适温度为 35 ℃。突变体 MsE_{E143A} 的最适 pH 如图 6(b)所示，当 pH 为 7.0 时，酶活力和 *L*-刺桐碱产量最高，升高或降低 pH 都会导致突变体酶活力下降，因此，最适 pH 为 7.0。最终，在最适温度和最适 pH 下进行酶反应，*L*-刺桐碱的产量达到(10.85±0.26) mg/L，相较于出发菌株提升了 175%。



(a) 温度对突变体 MsE_{E143A} 的影响



(b) pH对突变体 MsE_{E143A} 的影响

图 6　突变体 MsE_{E143A} 的酶学性质探究

Fig. 6　Enzymatic properties of mutant MsE_{E143A}

3　结论

作者为获得能够解除产物反馈抑制的转甲基酶，首先对在大肠杆菌内异源表达的转甲基酶 MsE 进行温度、诱导剂浓度的表达条件优化，然后通过分子对接，分别在活性口袋周围以及通道周围选取了 8 个“热点”氨基酸，并构建了一系列突变体进行酶活力测定和酶催化反应，筛选到一个酶活力和 *L*-刺桐碱产量均提高的突变体 MsE_{E143A}。其酶活力和产物产量比出发菌株分别提高了 1.37 倍和 1.42 倍。这是因为，143 位的 Glu 突变为 Ala 后，氨基酸侧链变小，减小了通道入口处的空间位阻，有利于产物及时从活性口袋内释放出来。通过半理性设计，对酶的结构进行模拟、预测，减少了筛选酶的工作量，也为解决其他酶的反馈抑制问题提供了更高效的参考策略。

参考文献

[1] LUAN G X，TIE F F，YUAN Z Z，et al. Hypaphorine，an indole alkaloid isolated from *Caragana korshinskii* kom.，inhibites 3T3-L1 adipocyte differentiation and improves insulin sensitivity *in vitro*[J]. Chemistry & Biodiversity，2017，14(7)：e1700038.

[2] CHAND K，AKANKSHA，RAHUJA N，et al. Major alkaloidal constituent from *Impatiens niamniamensis* seeds as antihyperglycemic agent[J]. Medicinal Chemistry Research，2011，20(9)：1505-1508.

[3] SUN H J，CAI W W，WANG X，et al. *Vaccaria* hypaphorine alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation *via* inactivation of NFκB and ERK pathways in Raw 264.7 cells[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine，2017，17(1)：120.

[4] DING Y H，MIAO R X，ZHANG Q. Hypaphorine exerts anti-inflammatory effects in sepsis induced acute lung injury *via* modulating DUSP1/p38/JNK pathway[J]. The Kaohsiung Journal of Medical Sciences，2021，37(10)：883-893.

[5] DITENGOU F A，RAUDASKOSKI M，LAPEYRIE F. Hypaphorine，an indole-3-acetic acid antagonist delivered by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*，induces reorganisation of actin and the microtubule cytoskeleton in *Eucalyptus globulus* ssp *bicostata* root hairs[J]. Planta，2003，218(2)：217-225.

[6] OZAWA M，HONDA K，NAKAI I，et al. Hypaphorine，an indole alkaloid from *Erythrina velutina*，induced sleep on normal mice[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters，2008，18(14)：3992-3994.

[7] YONEKAWA M K A，DE PENTEADO B，RODRIGUES A D，et al. *L*-hypaphorine and *D*-hypaphorine：specific antiacetylcholinesterase activity in rat brain tissue[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters，2021，47：128206.

[8] 曹斯琼，吴文平，罗宇琴，等. 王不留行炮制前后的UPLC

指纹图谱比较及刺桐碱和王不留行黄酮苷的含量测定[J]. 中国药房，2020，31(19)：2365-2370.
CAO S Q，WU W P，LUO Y Q，et al. Study on UPLC fingerprint of Vaccariae Semen before and after processing and content determination of erythrine and vaccarin[J]. China Pharmacy，2020，31(19)：2365-2370.(in Chinese)

[9] 戚梦婷，侯豹，蔡维维，等. 工业化提取中药王不留行中黄酮苷和刺桐碱的工艺探究[J]. 广州化工，2021，49(12)：90-92，119.
QI M T，HOU B，CAI W W，et al. Study on process of industrial extraction of vaccarin and hypaphorine from *Vaccaria segetalis*[J]. Guangzhou Chemical Industry，2021，49(12)：90-92，119.(in Chinese)

[10] 邱贺媛，肖小华，李攻科. 微波辅助提取-高效液相色谱分析制备鸡骨草中相思子碱和下箴刺桐碱的研究[J]. 分析科学学报，2011，27(3)：284-288.
QIU H Y，XIAO X H，LI G K. Analysis and preparation of abrine and hypaphorine in *Abrus cantoniensis* based upon microwave-assisted extraction coupled with high performance liquid chromatography[J]. Journal of Analytical Science，2011，27(3)：284-288.(in Chinese)

[11] KALAITZAKIS D，MONTAGNON T，ANTONATOU E，et al. One-pot synthesis of the tetracyclic framework of the aromatic *Erythrina* alkaloids from simple furans[J]. Organic Letters，2013，15(14)：3714-3717.

[12] 李洋，闫亚楠，赵春雷，等. 代谢工程改造大肠杆菌利用脂肪酸合成己二酸[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(3)：16-28.
LI Y，YAN Y N，ZHAO C L，et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for synthesis of adipic acid from fatty acids[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(3)：16-28.(in Chinese)

[13] JEONG J H，CHA H J，HA S C，et al. Structural insights into the histidine trimethylation activity of EgtD from *Mycobacterium smegmatis*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications，2014，452(4)：1098-1103.

[14] YU P，ZHU P Z. Improving the production of *S*-adenosyl-*L*-methionine in *Escherichia coli* by overexpressing metk[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology，2017，47(9)：867-873.

[15] 尹春丽，陶贵荣，许乐，等. 壳聚糖固定化*S*-腺苷甲硫氨酸合成酶[J]. 食品与生物技术学报，2013，32(9)：945-950.
YIN C L，TAO G R，XU L，et al. Study on characterizations of immobilized *S*-adenosylmethionine synthetase on chitosan microspheres[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2013，32(9)：945-950.(in Chinese)

[16] VIT A，MISSON L，BLANKENFELDT W，et al. Ergothioneine biosynthetic methyltransferase EgtD reveals the structural basis of aromatic amino acid betaine biosynthesis[J]. ChemBioChem，2015，16(1)：119-125.

[17] ZHANG Y C，LIU Y D，ZHANG S Y，et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* WM001 to improve *L*-isoleucine production[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry，2021，68(3)：568-584.

[18] 刘宁，徐建中. 改造乙酰羟酸合成酶提高*L*-亮氨酸产量[J]. 食品与生物技术学报，2023，42(9)：45-55.
LIU N，XU J Z. Improvement of *L*-leucine production by modifying acetohydroxy acid synthase[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42(9)：45-55.(in Chinese)

[19] BLEI F，FRICKE J，WICK J，et al. Iterative *L*-tryptophan methylation in *Psilocybe* evolved by subdomain duplication[J]. ChemBioChem，2018，19(20)：2160-2166.

（责任编辑：周玥）