

His-234 是毛白杨对香豆酸: CoA 连接酶的重要酶催化活性残基*

任百光¹⁾ 李德峰²⁾ 郑彩霞¹⁾ 盖颖¹⁾ 蒋湘宁^{1)**} 胡永林^{2)**}

¹⁾北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; ²⁾中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 对香豆酸: CoA 连接酶(4-coumarate: coenzyme A ligase, 4CL)是植物苯丙烷类代谢途径中的一个重要的酶。4CL 以肉桂酸衍生物(香豆酸、咖啡酸、阿魏酸等)、ATP 和 CoA 为底物合成相应的酰基-CoA 酯, 这些酰基-CoA 酯是一系列重要化合物(如木质素)的前体。4CL 的酶催化反应分两步进行: 第一步以肉桂酸衍生物和 Mg^{2+} -ATP 为底物合成酰基-AMP, 第二步用 CoA 取代 AMP, 产生酰基-CoA 酯, 催化过程中酶的构象产生明显的变化。因为 4CL 在木质素的合成中所起的作用, 这个酶是通过蛋白质工程方法改进林产品质量的重要靶标。我们通过 X 射线衍射技术, 解析了毛白杨对香豆酸: CoA 连接酶 1(Pt4CL1)与其中间产物对香豆酰-AMP 的复合物晶体结构, 与同家族成员结构比对, 确定所获得的蛋白质结构为 Pt4CL1 催化第二步反应, 即酰基-CoA 酯合成的构象。结构分析表明: His-234 残基在 Pt4CL1 的酶催化机理中起着多重作用, 即通过侧链与 AMP 磷酸基团形成氢键, 降低磷酸基团的负电荷, 催化 CoA 的亲核取代反应; 侧链可以采取两种不同的构象以调节 CoA 进入 Pt4CL1 的催化中心; His-234 的侧链还可能夺取 CoA 巯基的质子, 从而增强 CoA 的亲核反应活性。突变体酶活数据结果也显示 His-234 对 Pt4CL1 的活性非常重要, 是 Pt4CL1 催化中心的活性残基。

关键词 木质素合成, 4CL, 酶活机理, 晶体结构, 结构-功能关系

学科分类号 Q71

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00078

木质素是自然界中含量仅次于纤维素的天然有机聚合物, 据估计每年全球被植物固定的二氧化碳有 25%~30% 被转化为木质素。木质素对维持植物茎干的强度和硬度以及抵御致病微生物的侵袭起重要作用。同时, 木质素具有疏水性, 在植物的水分保持和水分与养分的运输中有不可替代的作用, 是植物由水生环境进化到陆生环境的关键物质。但由于木质素高疏水性和化学惰性致使其难以降解, 传统造纸业的脱木质素过程产生大量的污染物, 而新兴的利用生物质生产绿色能源的过程也同样因为木质素的化学惰性而降低纤维素等转化为乙醇的效率^[1]。因此, 研究木质素合成和调控以达到调节林产品中木质素的含量和组成, 从而提高林产品的利用率、降低林产品利用过程中的环境污染, 已经成为研究热点, 引起广泛的关注。

苯丙烷类代谢途径(phenylpropanoid pathway)是木质素合成途径的重要组成部分, 是重要的植物次

生代谢途径。植物中一切含有苯丙烷骨架的物质都由这条途径直接或间接生成, 这个途径产生的 CoA 酯是合成木质素单体以及非木质素类物质(如类黄酮类等次生代谢产物)的合成前体^[2]。

对香豆酰: 辅酶 A 连接酶(4-coumarate: coenzyme A ligase, 4CL)催化苯丙烷类代谢途径中的最后一个步骤, 产生高能分子酰基-CoA 酯。4CL 是苯丙烷类代谢途径的调控位点, 其活性的高低也是调节苯丙烷类代谢途径碳通量的最重要的因素, 因此, 4CL 的结构-功能关系和酶活机理是近年来备受重视的研究热点^[3]。

* 国家高技术研究发展计划(863)(2011AA100203)和国家重点基础研究发展计划(973)(2011CB910300, 2011CB911100)资助项目。

** 通讯联系人。

蒋湘宁. Tel: 010-62338063, E-mail: jiangxn@bjfu.edu.cn

胡永林. Tel: 010-64888548, E-mail: yonglin@ibp.ac.cn

收稿日期: 2013-02-26, 接受日期: 2013-04-26

已发现的 4CL 多存在于高等植物中, 近年在苔藓中也发现了 4CL 基因^[4]. 在多个物种中发现有两种或两种以上 4CL 基因, 并且不同的基因在不同的组织器官和发育状态下的表达是不同的^[5-9].

例如, 拟南芥中有 4 个 4CL 基因. 在与毛白杨亲缘关系很近的美洲山杨(*Populus tremuloides*)中有 2 个 4CL 基因, 序列相似度为 63%, Ptr4CL1 在茎中表达, 参与木质素的合成, Ptr4CL2 在表皮细胞和叶中表达, 与抗病性或植物外层防卫相关^[10].

4CL 属于 ANL 家族的酰基 -CoA 合成酶亚家

族. 这个家族的名称来自于它的三个亚家族的首字母: 酰基 -CoA 合成酶(Acyl-CoA synthetases)、非核糖体肽合酶的腺苷酰化结构域(NRPS adenylation domains)以及荧光素酶(luciferase). 这个家族的成员在酶反应过程都有一个腺苷酰化步骤. ANL 酶家族的催化反应分两步进行, 首先合成酰基 -AMP, 第二步反应大多产生酰基 -CoA 酯^[11]. 此家族的酶为变构酶, 催化两步反应时, 分别有相应的酶构象与其对应^[11-12]. 其中, 4CL 酶反应的示意图如图 1 所示.

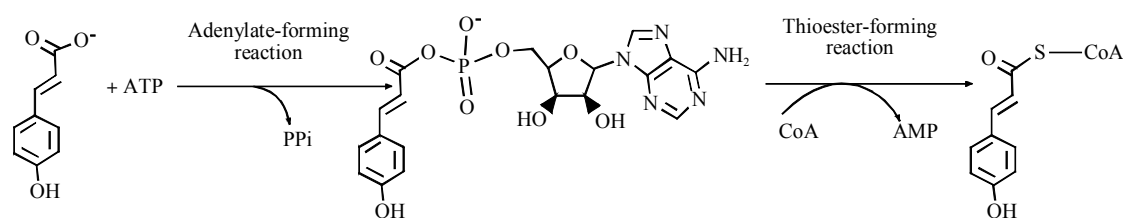


Fig. 1 Reactions catalyzed by 4-coumarate:coenzyme A ligase

2010 年, 中国科学院生物物理研究所王大成组与北京林业大学蒋湘宁实验室合作解析了毛白杨(*Populus tomentosa*)Pt4CL1 以及 Pt4CL1 与反应产物 AMP 和反应中间物类似物 adenosine 5'-(3-(4-hydroxyphenyl)propyl)phosphate (APP)复合物的分辨率晶体结构^[13], 其中 Pt4CL1 与 AMP 和 APP 的复合物结构为催化酰基 -CoA 酯生成的构象. 通过结构分析确定了酶的催化中心、酶与底物的结合口袋, 并配合酶活性实验, 分析了酶的催化机制, 确定了 3 个残基(Lys-438、Gln-443 和 Lys-523)为 Pt4CL1 的催化活性残基. 其中, Lys-523 催化酰基 -AMP 的合成, Lys-438 和 Gln-443 为催化酰基 -CoA 酯生成的关键残基. 同时也观察到 Pt4CL1 与 AMP 和 APP 的两个复合物晶体结构基本相同, 但是 His-234 残基在这两个复合物结构中却有完全不同的构象. 在 Pt4CL1-AMP 复合物中, His-234 侧链指向对香豆酸的结合口袋, 同时堵塞了 CoA 的结合口袋. 而在 Pt4CL1-APP 复合物结构中, His-234 侧链不与中间产物作用, 同时也不阻碍 CoA 与中间产物的相互作用. 这表明 His-234 可能在酶的催化过程中有构象变化, 因此, 这个残基在 4CL 的酶活机理中可能起着重要作用.

为深入研究 His-234 在 Pt4CL1 酶催化过程中

的作用, 我们以 X 射线晶体衍射技术获得了 Pt4CL1 与其天然中间产物对香豆酰 -AMP 复合物结构的高分辨率结构. 在这个结构中 His-234 侧链的取向与其在 Pt4CL1-AMP 复合物相同, 侧链中的 Ne2 原子与对香豆酰 -AMP 磷酸基团的一个氧原子形成氢键. 因此, His-234 可能在催化对香豆酰 -AMP 形成中起作用. 但是它的侧链在其复合物结构中阻碍 CoA 进入 Pt4CL1 的活性中心, 阻止 CoA 对对香豆酰 -AMP 的亲核攻击. 这说明在第二步反应过程中, His-234 侧链的位置必须发生变化, 因此, 这个残基在第二步反应中具有特殊作用. 结构及酶催化机理的分析表明, His-234 侧链位置的变化可能伴随着它对 CoA 活性巯基的脱质子, 生成亲核攻击能力更强的 -S- 基团, 从而催化第二步反应的进行. 对 Pt4CL1 母体蛋白及其 H234A 突变体的酶活测定也证明了这个残基在催化机制中的重要性.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 基因、表达菌株和表达载体. 实验中所采用的基因 Pt4CL1 为北京林业大学蒋湘宁实验室从毛白杨 cDNA 中克隆得到, GenBank 编号 AY043495. 采用的表达菌株为 M15, 表达载体为 pQE31.

1.1.2 试剂. 香豆酸、ATP、MES 购自 Sigma-Aldrich 公司; 柠檬酸铵和 CoA 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; DNA 聚合酶 Primer star 购自 TAKARA 公司; 限制性内切酶 *Dpn* I 购自 NEB 公司.

1.2 方法

1.2.1 Pt4CL1 突变体 H234A 的构建. 设计突变体引物 5' CTGTGTGTGCTGCCTATGTTTCGCTATCT-ATGCTCTGAATTCAAT 3' 和 5' ATTGAATTCA-GAGCATAGATAGCGAACATAGGCAGCACACA-CAG 3' 以表达载体 pQE31-4CL1 为载体 PCR, 所得 PCR 产物用 *Dpn* I 酶切, 酶切产物直接用于转化大肠杆菌感受态细胞 Trans10, 涂布 LB 平板(含 100 mg/L 氨苄青霉素), 获得单菌落, 接种于 5 ml LB 培养基中(含 100 mg/L 氨苄青霉素) 310K, 220 r/min 下培养 12 h, 提取质粒测序验证.

1.2.2 Pt4CL1 的表达. 将表达载体 pQE31-4CL1 转化入 M15 菌株, 涂布 LB 平板(含 100 mg/L 氨苄青霉素, 25 mg/L 卡那霉素, 以后所使用的培养基均含有相同含量的抗生素), 310 K 培养 12 h, 挑取单菌落接种于 5 ml LB 液体培养基中, 310 K 下 220 r/min 培养 12 h 或过夜, 以 3%的接种量转接入 50 ml LB 培养基中, 培养 3 h, 再以 3%接种量转接入 1L 培养基中扩大培养, 大约 3 h 后, 在细菌 A_{600} 达到 0.6 时将温度迅速降至 301 K, 加入 0.4 mmol/L IPTG 诱导表达, 继续培养 8 h 后 277K, 4 000 r/min 离心 30 min 收集细菌.

1.2.3 Pt4CL1 的纯化. 将细菌重悬于裂解缓冲液(50 mmol/L PBS pH 7.5、10 mmol/L 咪唑、300 mmol/L 氯化钠、10% 甘油), 超声破碎(超声 4 s、间隔 10 s、功率为 220W, 重复 99 次). 裂解液在 277 K 下, 14 000 r/min 离心 30 min. 取上清用蠕动泵以 0.5 ml/min 的流速缓缓加入 Ni-NTA 柱中(Ni-NTA 柱在上样前需用裂解缓冲液平衡 4 个柱体积), 上样完成后用清洗缓冲液(50 mmol/L PBS pH 7.5、20 mmol/L 咪唑、300 mmol/L 氯化钠、10% 甘油)清洗与 Ni-NTA 结合的杂蛋白, 至紫外分光光度法检测 A_{280} 的示数无变化, 以洗脱缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5、250 mmol/L 咪唑、300 mmol/L 氯化钠、10% 甘油)洗脱蛋白. 所得蛋白溶液经过低速离心(4 000 r/min)浓缩后, 使用 HiLoad 16/60 Superdex 75 XK 分子筛层析柱进一步纯化, 分子筛层析柱首先用 140 ml 分子筛缓冲

液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5、2 mmol/L DTT、1 mmol/L EDTA、100 mmol/L 氯化钠、10% 甘油)平衡, 保持 1 ml/min 的流速上样和洗脱蛋白, 收集相应的洗脱产物, 低速离心(4 000 r/min)浓缩至大约 20 g/L 后保存在 193K 下备用. 提纯过程中的每一步都使用 15% SDS-PAGE 检测目的蛋白的纯度, 确保最终得到的蛋白质纯度 >95%, 可以用于蛋白质结晶实验. 突变体蛋白的提取与母体相同.

1.2.4 酶活测定. Pt4CL1 的产物香豆酰辅酶 A 在波长为 333 nm 时有特异性光吸收, 可以使用紫外分光光度法检测辅酶 A 酯的生成, 测定酶活系数^[9]. 反应体系: 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 5 mmol/L $MgCl_2$, 5 mmol/L ATP, 0.25 mmol/L CoA 和 0.005~0.05 mmol/L 对香豆酸, 反应温度为 298 K. 体系中 Pt4CL1 母体的终浓度为 25 pmol/L, H234A 突变体的终浓度为 2500 pmol/L(蛋白质浓度以 Bradford 法测定^[10]). 以双倒数作图法求得酶的 K_m 和 k_{cat} .

1.2.5 Pt4CL1 的结晶.

蛋白经过分子筛纯化, 浓缩后加入如下反应体系中: 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 5 mmol/L $MgCl_2$, 5 mmol/L ATP 和 2 mmol/L 对香豆酸, 298 K 下反应 1 h, 然后低速离心(4 000 r/min)浓缩至终浓度为 20 g/L 用于蛋白质结晶.

使用悬滴法结晶蛋白, 沉淀剂溶液为 50 mmol/L MES, pH 6.0 和 1.8 mol/L 柠檬酸铵. 将蛋白质溶液与沉淀剂溶液以 1:1 在硅化的盖玻片上混合后倒置于含有 450 μ l 沉淀剂溶液的反应池上, 用真空脂密封. 液滴在 298 K 下静置 1 周以上可以收集到用于衍射数据采集的方块状晶体.

1.2.6 数据收集与结构解析和修正.

在日本筑波 KEK 同步辐射站光子厂 beam line 17A 收集到可用于结构解析的晶体衍射数据. 采用 ADSC Quantum 系列的 CCD 探测器, 数据采集使用的 X 射线波长为 0.96417Å.

用 Mosflm^[11]指标化和积分, 用 CCP4^[12]中的 Scala 进行数据统一和合并, 以 AMP-4CL1^[13]的结构为模板用 Phenix^[17]的 AutoMR 进行分子置换, 得到初步模型后, 使用 Coot^[18]手动调节模型和 PHENIX 的 PhenixRefine 自动优化进行循环修正. Pt4CL1 与香豆酰 -AMP 复合物的最终模型通过 PHENIX 的 Comprehensive Validation 计算所得各项指标均在合理范围(表 1).

Table 1 Statistics on data collection, structure refinement, model assessment

Crystal	Pt4CL1-(4-coumaroyl-AMP)
Space group	I2 ₁ 3
Cell parameters/Å	160.70=160.70=160.70
Wavelength/Å	0.96417
Res. (last shell)/Å	56.82-2.2 (2.32-2.2)
Total reflections	567533
Unique reflections	35086
Completeness (last shell)	100 (100)
Redundancy (last shell)	16.2 (14.8)
<i>I</i> / σ (<i>I</i>) (last shell)	21.6 (5.3)
Rmerge (last shell)	0.108 (0.594)
Refinement statistics	
<i>R</i>	0.1586
Free <i>R</i>	0.2134
Protein atoms	4054
Water molecules	279
R.M.S. deviations	
Bond/Å	0.010
Angles	1.281

2 结 果

2.1 Pt4CL1 与中间产物香豆酰-AMP 的复合物晶体结构

Pt4CL1 与香豆酰 -AMP 复合物晶体结构的分辨率为 2.2Å, 结构优化的 *R* 因子为 0.1586, *R*_{free} 为 0.2134. Pt4CL1 蛋白分子含有 536 个氨基酸, 整个分子由两个相对独立的结构域组成: 1~434 组成 N 端结构域, 435~536 组成 C 端结构域. 两个结构域由一段柔性结构区连接. 通过与未添加复合物小分子的 Pt4CL1 晶体结构(PDB ID: 3A9U)的对比发现, 如以晶体的 N 端结构域位置为参考, C 端结构域在酶催化过程中会有较大角度的偏转.

在结构优化的过程中, 在 Pt4CL1 分子内部观察到一组很强的电子密度, 其大小和形状与 Pt4CL1 催化过程的中间产物香豆酰 -AMP 匹配良好(图 2a, b), 表明我们获得的晶体是 Pt4CL1 与香豆酰 -AMP 的复合物.

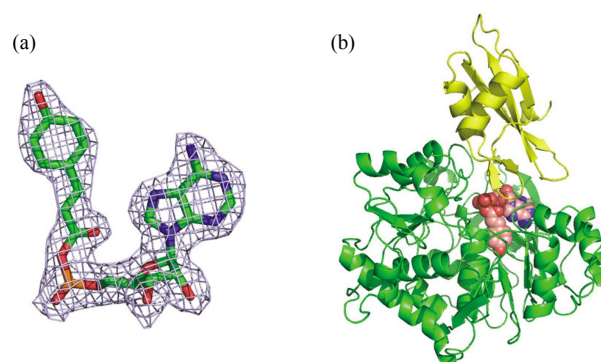


Fig. 2 Overall structure of the Pt4CL1-(4-coumaroyl-AMP) complex

(a) The σ_A -weighted 2Fo-Fc omit map around the bound 4-coumaroyl-AMP, contoured at 6σ . The map is superimposed on the final model of the ligand. The C, O, and N atoms of the ligand are colored green, red, and blue, respectively. (b) Structure of the Pt4CL1-(4-coumaroyl-AMP) complex. The N- and C-domains are shown as green and yellow, respectively. 4-coumaroyl-AMP is shown as balls, with C, O, and N atoms colored in pink, red, and blue, respectively.

香豆酰 -AMP 与 Pt4CL1 之间形成多个氢键和疏水作用. 其中, AMP 基团与 Pt4CL1 之间的作用与其在 Pt4CL1-APP 复合物结构中基本相同^[3]. 磷酸与羧基形成的酸酐基团与附近的 4 个极性氨基酸 His-234、Thr-433、Lys-438 和 Gln-443 形成多个氢键(图 3). 其中 Lys-438 的 NZ 原子与香豆酰中的羰基氧原子形成氢键, Gln-443 的 NE2 原子与磷酸基团的 O1P 和 O2P 原子形成两个氢键, His-234 的 NE2 原子与磷酸基团的 O3P 原子形成氢键. 香豆酰是一个平面的基团, 在与平面垂直的方向上, 苯环在两侧分别与两个平面(Tyr-236 侧链平面, Tyr-330 和 Gly-331 的肽主链平面)形成疏水作用. 在与香豆酰平面平行的方向上, 苯环的两侧分别受到 Gly-305 主链和 Pro-337、Val-338 侧链的限制, 这 4 个蛋白基团共同形成了香豆酸的结合口袋. 在口袋的末端, Ser-240 侧链的 OG 原子以及 Lys-303 侧链的 NZ 原子分别与香豆酰 4- 羟基的氧原子形成氢键(图 3). 由于香豆酰中参与形成氢键的均为不变的基团(侧链的羧基和 4- 羟基), 而苯环由疏水作用固定, Pt4CL1 的底物特异性完全决定于它的结合口袋的大小.

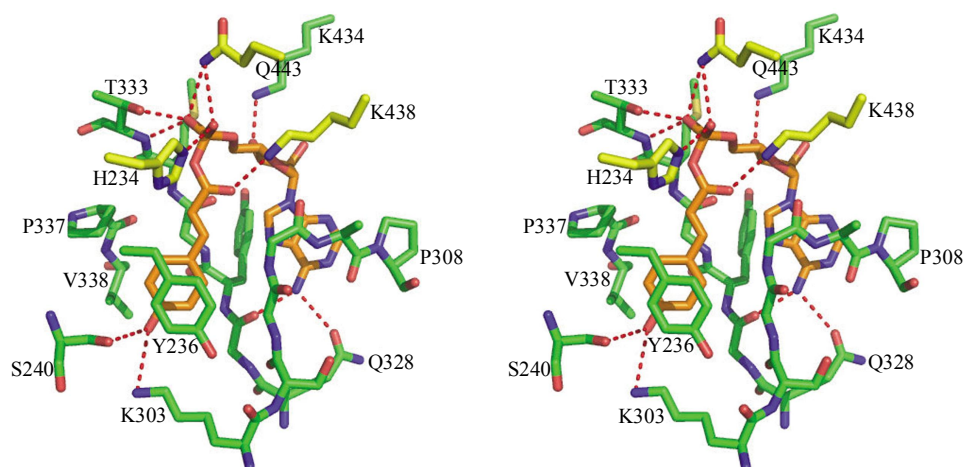


Fig. 3 Interactions of 4-coumaroyl-AMP and Pt4CL1

Stereoview of Pt4CL1-(4-coumaroyl-AMP) interactions. O and N are colored red and blue. 4-coumaroyl-AMP is colored orange. The residues essential for catalytic activities (H234, K438 and Q443) are colored yellow and other residues are colored green. Hydrogen bonds between 4-coumaroyl-AMP and Pt4CL1 are shown as red dashed lines.

来自于 *Alcaligenes sp.* AL3007 的 4-Chlorobenzoate: CoA Ligase (CBL) 是 ANL 家族中结构 - 功能关系和酶学机理研究最为透彻的成员之一, 它的两步酶促反应都被捕捉到了相应的晶体结构. 对比 Pt4CL1-(香豆酰 -AMP) 复合物与 CBL 的酰基 -CoA 复合物 (即第二步反应, PDB ID: 3CW9) 的晶体结构, 在三维结构叠合中这 2 个蛋白分子中的 459 个 C α 原子

位置相互匹配, RMSD=2.27Å. 同时, 结构对比显示 Pt4CL1-(香豆酰 -AMP) 复合物中存在一个由 N 端和 C 端结构域共同组成并深入香豆酰 -AMP 结合位点的通道, 尽管 His-234 的侧链堵塞了这个通道, 但通道的其他部分与 CBL 复合物中的酰基 -CoA 配体匹配良好 (图 4a, c). 这说明 Pt4CL1-(香豆酰 -AMP) 复合物结构基本具有结合最终产物酰基 -

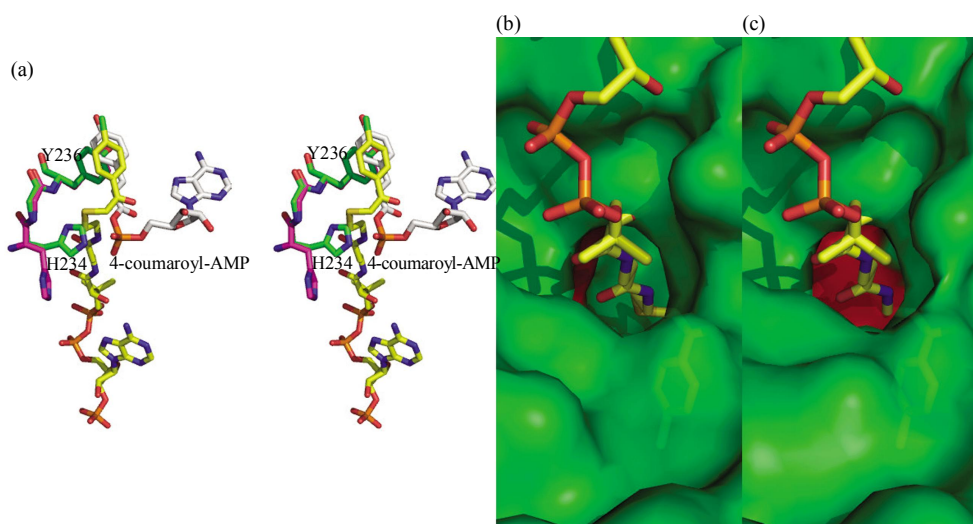


Fig. 4 The CoA binding site of Pt4CL1

(a) Stereoview of CoA binding side. Pt4CL1-(4-coumaroyl-AMP) complex structure and Pt4CL1-APP complex structure are both superposed on the thioester-forming structure of CBL. The thioester product in CBL is colored yellow. 4-coumaroyl-AMP is colored silvery. The residues are colored green in Pt4CL1-(4-coumaroyl-AMP) complex and violet in Pt4CL1-APP complex. The side chain of His-234 from Pt4CL1-(4-coumaroyl-AMP) complex structure blocks the superposed thioester product from CBL. (b) The thioester product of CBL thioester-forming structure fit into the pantetheine binding tunnel of Pt4CL1-APP complex structure upon structure superposition based on the C α atoms of the proteins. The Pt4CL1-APP complex structure is presented as green surface. The residue His-234 is colored red. (c) The thioester product of CBL thioester-forming structure fit into the pantetheine binding tunnel of Pt4CL1-(4-coumaroyl-AMP) complex structure near the protein surface but blocked near the active center by His-234. The Pt4CL1-(4-coumaroyl-AMP) complex structure is presented as green surface. The residue His-234 is colored red.

CoA 的结合位点, 处于酰基 -CoA 的生成构象. 以上两点证明 Pt4CL1-(香豆酰 -AMP)复合物与 2010 年报道的 4CL1-AMP(PDB ID: 3A9V)以及 4CL1-APP(PDB ID: 3NI2)这两个复合物相同, 都处于合成酰基 -CoA 的构象^[11-13]. His-234 的侧链在 Pt4CL1-(香豆酰 -AMP)复合物结构中阻塞了 CoA 进入反应中心的通路, 说明这个残基在酰基 -CoA 形成的过程中将有较大的位置变动. 事实上电子密度图显示 His-234 侧链有两个不同的构象, 以阻塞 CoA 通路的构象为主要构象, 另一个开放 CoA 通路的构象上只有少量的电子密度, 有趣的是这个次要构象与 Pt4CL1-APP 复合物结构中的 His-234 侧链基本重叠. 这可能是由于 APP 是香豆酰 -AMP 的类似物, 其侧链的 3 个碳原子由碳 - 碳单键形成, 不具有香豆酰 -AMP 的碳 - 碳双键和碳 - 氧双键形成的共轭平面. 这个侧链的 C1 和 C2 碳原子均向 His-234 侧链方向凸起, 由此产生的空间排斥使得 Pt4CL1-APP 复合物中的 His-234 侧链摆动到远离 APP 的构象. 而 Pt4CL1-AMP 复合物中不存在类似的空间排斥, 因此, 这个结构的 His-234 与 Pt4CL1-(香豆酰 -AMP)中 His-234 的构象基本相同. 这些结构特征支持了我们关于 His-234 残基位置变动的假设. 这提示 His-234 可能是重要的酶活性中心^[12].

2.2 4CL1 母体与 H234A 突变体的酶活结果

固定 ATP、CoA、Mg²⁺ 的浓度, 以香豆酸浓度为梯度标定酶反应速率, 以双曲线作图法求得酶反应常数, 结果显示, 将 234 位的组氨酸突变成丙氨酸后, 4CL1 对香豆酸的结合力明显减小, 催化效率更是大大降低, 由此可见, 234 位的组氨酸在酶与底物的结合和催化中起到重要作用(表 2).

Table 2 Kinetic properties of Pt4CL1 and its mutant H234A

	4CL1	H234A	4CL1/H234A
$K_m/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	0.0214±0.0015	0.122±0.024	1/5.70
k_{cat}/s^{-1}	2.05±0.10	0.0712±0.0025	28.8
$(k_{cat}/K_m)/(\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{s}^{-1})$	95.8±1.9	0.586±0.015	163

3 讨 论

4CL1 属于 ANL 家族中的芳香酰 -CoA 连接酶亚家族, 催化肉桂酸衍生物与辅酶 A 生成芳香酰 -

CoA, 在催化过程中需要消耗一个 ATP 分子, 并产生一个 PPi 和一个 AMP 分子. ANL 家族酶在催化过程中发生大规模的构象变化, 两步反应分别由两个不同的构象催化完成. 通过与家族的其他成员, 特别是 4-Chlorobenzoate:CoA Ligase 的结构比对, 我们确定所得的 4CL1 晶体与香豆酰 -AMP 的复合物属于催化第二步反应的构象^[11-12]. 因此, 上一节中结构分析所涉及的 Pt4CL1 的关键残基可能是其催化第二步反应, 即 CoA 对香豆酰 -AMP 的亲核取代、形成香豆酰 -CoA 的酶活中心.

在 4CL1 催化机理中起重要作用的氨基酸残基之中, Lys-438 和 Gln-443 这两个残基在催化酰基 -CoA 形成时通过与香豆酸羰基和磷酸基团的氧原子形成氢键降低羧酸 - 磷酸酐基团的负电荷, 促进 CoA 对其中羰基碳的亲核攻击.

在 Pt4CL1 与香豆酰 -AMP 的复合物结构中, His-234 的侧链阻塞了 CoA 的结合位点. 因此, 在香豆酰 -CoA 的形成过程中, His-234 侧链需要通过某种构象变化以开放 CoA 的结合通道, 因此在 CoA 对酰基 -AMP 的羰基碳进行亲核取代时 His-234 的侧链将不处于目前复合物结构中观察到的位置. His-234 所起的作用也就必然不同于 Lys-438 和 Gln-443, 这两个残基的作用是通过氢键的形成降低羧酸 - 磷酸酐基团的负电荷, 在催化过程中没有构象变化. 在 CoA 进入 Pt4CL1 酶活中心的过程中, His-234 将从其所显示的构象变成 Pt4CL1-APP 复合物结构所显示的构象, 从而形成 CoA 的结合口袋(图 4). 由于 CoA 需要通过 His-234 侧链所处的位置, 可以与其发生相互作用. His-234 的作用可能类似于木瓜蛋白酶中 His-159. 在木瓜蛋白酶的催化机制中, His-159 的侧链咪唑基团对酶活中心残基 Cys-25 的侧链巯基去质子化, 从而加速 Cys-25 对底物肽链的亲核攻击, 而 Asn-157 残基在这个过程中协助固定 His-159 的侧链咪唑基团^[9]. 在 Pt4CL1 催化酰基 -CoA 形成的过程中, 酰基 -AMP 的磷酸基团通过氢键固定 His-234 咪唑环的位置并将其去质子化, 丢失质子的咪唑基团夺取 CoA 巯基的质子, 并通过旋转 His-234 的 C α -C β 键转移到另一位置, 开放 CoA 进入 Pt4CL1 活性中心的通道. CoA 去质子的 -S- 基团亲核攻击酰基 -AMP 的羰基碳, 形成酰基 -CoA 和 AMP.

在整个 ANL 家族中, 与 His-234 对应的氨基酸是相对保守的, 都为芳香族氨基酸. 具体的氨基

酸与亚家族对应, 在非核糖体肽合酶腺苷酰化结构域亚家族中基本为苯丙氨酸, 小链酰基-CoA 合成酶中为色氨酸, 长链和芳香酰-CoA 合成酶以及荧光素酶亚家族中为组氨酸^[11]. 家族成员中, 处于酰基-CoA 生成构象的结构, 其与 His-234 对应的氨基酸残基基本处于允许 CoA 与蛋白质分子结合的构象, 而酰基-AMP 生成构象中基本处于阻碍 CoA 结合的构象^[12, 20-23].

Pt4CL1 与其他 ANL 家族的酶一样, 其 ATP 结合位点序列保守, 分子结构较为僵硬, 因此 His-234 可能在 Pt4CL1 的第一步反应过程中同样与 ATP 的 α -磷酸基团形成氢键, 参与 Pt4CL1 的第一步反应, 即香豆酰-AMP 生成的催化过程. 突变体酶活性分析显示, CBL 中与 4CL1 相对应的氨基酸 His-207 在两步反应中都起到重要作用^[11], 这也进一步支持了我们的推论.

通过对 Pt4CL1 与香豆酰-AMP 复合物的晶体结构分析, 并将其与 Pt4CL1-APP 复合物和其他 ANL 家族酶进行结构对比, 以及对 Pt4CL1 及其相关突变体的酶活鉴定, 我们证明了 His-234 残基是 Lys-438、Gln-443 和 Lys-523 之外的另一个在 Pt4CL1 酶活机制中起重要作用的残基. 在 Pt4CL1 酶活机理的第一步反应中, His-234 与 ATP 的 α -磷酸基团形成氢键, 降低磷酸基团的负电荷, 促进反应的进行, 同时, 它的侧链位置阻止 CoA 过早进入 Pt4CL1 的活性中心. 在第二步反应中 His-234 通过侧链的构象变化开放 CoA 进入活性中心的通路, 同时夺取 CoA 巯基的质子, 增强 CoA 亲核攻击香豆酰-AMP 的能力, 催化最终产物的形成. 因此, 在 Pt4CL1 酶催化的两步反应中 His-234 都起到重要作用, 是 Pt4CL1 重要的酶催化残基.

参 考 文 献

- [1] Vanholme R, Morreel K, Darrah C, *et al.* Metabolic engineering of novel lignin in biomass crops. *The New Phytologist*, 2012, **196**(4): 978-1000
- [2] Yonekura-Sakakibara K, Tohge T, Matsuda F, *et al.* Comprehensive flavonol profiling and transcriptome coexpression analysis leading to decoding gene-metabolite correlations in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2008, **20**(8): 2160-2176
- [3] Knobloch K H, Hahlbrock K. Isoenzymes of p-Coumarate: CoA ligase from cell suspension cultures of *Glycine max*. *Euro J Biochem*, 1975, **52**(2): 311-320
- [4] Silber M V, Meimberg H, Ebel J. Identification of a 4-coumarate: CoA ligase gene family in the moss, *Physcomitrella patens*. *Phytochem*, 2008, **69**(13): 2449-2456
- [5] Ehling J, Buttner D, Wang Q, *et al.* Three 4-coumarate: coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. *The Plant J*, 1999, **19**(1): 9-20
- [6] Zhang Y, Brown G, Whetten R, *et al.* An arabinogalactan protein associated with secondary cell wall formation in differentiating xylem of loblolly pine. *Plant Mol Biol*, 2003, **52**(1): 91-102
- [7] Lindenmayr C, Mollers B, Fliegmann J, *et al.* Divergent members of a soybean (*Glycine max* L.) 4-coumarate: coenzyme A ligase gene family. *European J Biochem*, 2002, **269**(4): 1304-1315
- [8] Hamberger B, Hahlbrock K. The 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Arabidopsis thaliana* comprises one rare, sinapate-activating and three commonly occurring isoenzymes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(7): 2209-2214
- [9] Voo K S, Whetten R W, O'Malley D M, *et al.* 4-coumarate: coenzyme a ligase from loblolly pine xylem. Isolation, characterization, and complementary DNA cloning. *Plant Physiol*, 1995, **108**(1): 85-97
- [10] Hu W J, Kawaoka A, Tsai C J, *et al.* Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate: CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(9): 5407-5412
- [11] Gulick A M. Conformational dynamics in the Acyl-CoA synthetases, adenylation domains of non-ribosomal peptide synthetases, and firefly luciferase. *Chem Biol*, 2009, **4**(10): 811-827
- [12] Reger A S, Wu R, Dunaway-Mariano D, *et al.* Structural characterization of a 140 degrees domain movement in the two-step reaction catalyzed by 4-chlorobenzoate: CoA ligase. *Biochem*, 2008, **47**(31): 8016-8025
- [13] Hu Y, Gai Y, Yin L, *et al.* Crystal structures of a *Populus tomentosa* 4-coumarate: CoA ligase shed light on its enzymatic mechanisms. *The Plant Cell*, 2010, **22**(9): 3093-3104
- [14] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**(1-2): 248-254
- [15] Rossmann M G, van Beek C G. Data processing. *Acta Crystallogr D*, 1999, **55**(Pt10): 1631-1640
- [16] Brunger A T, Adams P D, Clore G M, *et al.* Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D*, 1998, **54**(Pt5): 905-921
- [17] Adams P D, Afonine P V, Bunkoczi G, *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D*, 2010, **66**(Pt2): 213-221
- [18] Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D*, 2004, **60**(Pt12Pt1): 2126-2132
- [19] Rawlings N D, Barrett A J. Families of cysteine peptidases. *Methods Enzym*, 1994, **244**(1): 461-486
- [20] Gulick A M, Starai V J, Horswill A R, *et al.* The 1.75 Å crystal structure of acetyl-CoA synthetase bound to adenosine-5'-propylphosphate and coenzyme A. *Biochem*, 2003, **42**(10): 2866-2873
- [21] Kochan G, Pilka E S, von Delft F, *et al.* Structural snapshots for the conformation-dependent catalysis by human medium-chain

- acyl-coenzyme A synthetase ACSM2A. *J Biol Chem*, 2009, **388**(5): 997–1008
- [22] Shah M B, Ingram-Smith C, Cooper L L, *et al.* The 2.1 Å crystal structure of an acyl-CoA synthetase from *Methanosarcina acetivorans* reveals an alternate acyl-binding pocket for small branched acyl substrates. *Proteins*, 2009, **77**(3): 685–698
- [23] Yonus H, Neumann P, Zimmermann S, *et al.* Crystal structure of DltA. Implications for the reaction mechanism of non-ribosomal peptide synthetase adenylation domains. *J Biol Chem*, 2008, **283**(47): 32484–32491

His-234 is an Essential Residue for *Populus tomentosa* 4-coumarate : CoA Ligase Enzymatic Mechanisms*

REN Bai-Guang¹⁾, LI De-Feng²⁾, ZHENG Cai-Xia¹⁾, GAI Ying¹⁾, JIANG Xiang-Ning^{1)**}, HU Yong-Lin^{2)**}

¹⁾ College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

²⁾ Institute of Biophysics, National Laboratory of Biomacromolecules, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract The 4-coumarate : CoA ligase (4CL) is one of the most important enzymes of the plant specific phenylpropanoid pathway. It catalyzes the syntheses of coumaroyl-CoA thioesters, the precursors of lignin and other important phenylpropanoids, from corresponding coumarate compounds such as 4-coumaric acid, caffeic acid, and 3-methoxy-4-coumaric acid, ATP, and coenzyme A, in two-step reactions that involves the formation of coumarate-AMP anhydride as intermediates and subsequent formation of the the coumaroyl-CoA thioesters through the nucleophilic substitution of the AMP group by CoA. Because of the important roles played by 4CL in the biosynthesis of lignin, this protein has become the target of bioengineering aimed at improving the quality of plant products. We have solved the crystal structure of *Populus tomentosa* 4CL1 (Pt4CL1) complexed with its enzymatic intermediate 4-coumarate-AMP anhydride. The Pt4CL1 was found to adopt the conformation of the second step reaction based on comparisons with other members from the same superfamily. Structural analysis revealed that the residue His-234, which forms a hydrogen bond to the phosphate group of the 4-coumarate-AMP anhydride through its side chain imidazole group, plays essential roles in the enzymatic mechanisms of Pt4CL1, including facilitating both steps of the reactions by forming a hydrogen bond to, and reducing the negative charge of, the phosphate group; de-protonating the thiol group of CoA; and regulating the access of the active site to CoA through the conformational changes of its side chain. Enzymatic assays on Pt4CL1 and relevant mutant verified that His-234 is an essential residue of this enzyme.

Key words lignin biosynthesis, 4CL, enzymatic mechanisms, crystal structure, structure-function relationship

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00078

*This work was supported by grants from Hi-Tech Research and Development Program of China (2011AA100203) and National Basic Research Program of China (2011CB910300, 2011CB911100).

**Corresponding author.

JIANG Xiang-Ning. Tel: 86-10-62338063, E-mail: jiangxn@bjfu.edu.cn

HU Yong-Lin. Tel: 86-10-64888548, E-mail: yonglin@ibp.ac.cn

Received: February 26, 2013 Accepted: April 26, 2013