doi: 10.7503/cjcu20130792

# 嗜热蛋白酶 PH1704 别构中心量子化学 计算与突变体动力学

詹冬玲<sup>1,2</sup>、高 楠<sup>3</sup>、韩葳葳<sup>1</sup>、冯 雁<sup>1</sup>

(1. 吉林大学分子酶学工程教育部重点实验室,长春 130012;

2. 吉林农业大学食品科学与工程学院, 长春 130118;

3. 中国科学院长春应用化学研究所,长春 130022)

**摘要** 通过量子化学计算,确定嗜热菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 的 PH1704 蛋白酶别构位点的关键残基为 Arg113, Tyr120 和 Asn129.其中, Arg113 及 Asn129 与别构抑制剂结合,参与别构调控.Tyr120 残基位于亚基交界面附近,并与亲核残基 Cys100 之间以氢键相连,可通过影响亚基聚合来影响酶的亲核催化.DJ-1 超家族的 4 种构建蛋白的结构显示,120 位点位于亚基交界面处,影响亚基的聚合,进而影响蛋白酶的活力,并间接参与别构调控.分子生物学实验显示,突变体 R113T/Y120P/N129D 的 *k*<sub>cat</sub>/*k*<sub>m</sub>(L・μmol<sup>-1</sup>・min<sup>-1</sup>)值 是野生型 *k*<sub>cat</sub>/*k*<sub>m</sub>值的 6 倍,*h* 系数由野生型的 0.86 转变为 1.3,负协同效应消失.113 和 129 位点处阴离子 别构剂脱离,从而破坏 113,120 和 129 位点间的封闭环结构,使 AC 交界面 α7 螺旋(124 ~ 129,524 ~ 529)间聚合度增强;120 位点残基由 Tyr 转变为 Pro,与 Cys100 间氢键断裂,亲核进攻的阻力减小,从而使酶活力提高,别构负调控消失.

关键词 嗜热蛋白酶;量子化学计算;别构中心;定点突变 中图分类号 0641:0623 文献标志码 A

蛋白酶是一类广泛应用于食品、医药、洗涤剂、纺织及皮革处理等方面的重要工业用酶. 普通蛋 白酶作为生物大分子的活性物质,因其在保存和应用的过程中常出现不稳定的现象而易失活,因此在 应用上受到了较大的限制. 嗜热蛋白酶具有良好的对抗高温、酸碱、有机溶剂及蛋白变性剂的性质, 还具有热稳定性好、酶制剂制备成本低、动力学反应快、对反应冷却系统要求标准低、能耗低及产物 纯度高等优点,因此在工业领域得到了广泛的应用. 近十几年来,对嗜热寡聚蛋白酶结构与功能的研 究已成为蛋白质学的前沿领域之一.

PH1704 蛋白酶是嗜热寡聚蛋白酶,属于 DJ-1/ThiJ/PfpI 超家族的一员<sup>[1~3]</sup>中的 PfpI 亚家族.此家族成员的空间结构相似,功能各异,其中包括伴侣蛋白、蛋白酶、激酶、压力蛋白、硫胺合成酶和 DJ-1 蛋白.其中人体蛋白 DJ-1 已被确定为致癌基因(当过度表达时)和神经保护蛋白,其缺失或失活会导 致早期帕金森疾病<sup>[4]</sup>.DJ-1 超家族的所有成员都是寡聚体,聚合幅度变化很大,从二聚体到二十聚 体,且家族成员寡聚接触面均不相同<sup>[5]</sup>.DJ-1 家族所有成员都有一个相似的结构域,即存在于α螺旋 和β片层间的被称为"亲核肘"的一个急剧转角<sup>[6]</sup>.除DJ-1,YedR,Hsp31,PfpI和 PH1704外,DJ-1超 家族的大多数成员的功能均未知,在 PfpI 亚家族中,只有 3L18,PfpI 和 PH1704 具有蛋白酶活力.根 据二聚体亚基交界面区域的不同,将寡聚模式分为4种类型,即 DJ-1,YhbO,HSP 和 YDR 型.PH1704 蛋白酶以指环状的六聚体或十二聚体形式存在,是 YhbO 型二聚体形式的六聚体。Cha 等<sup>[7]</sup>认为, YhbO 类型的六聚体真正具有蛋白酶的活力.

韩葳葳, 女, 博士, 副教授, 主要从事计算生物学研究. E-mail: weiweihan@jlu.edu.cn

收稿日期: 2013-08-15.

基金项目:国家"九七三"计划项目(批准号:2012CB721003)、国家自然科学基金(批准号:31070638)和吉林省自然科学基金(批 准号:201015109)资助.

联系人简介: 冯 雁, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生物化学与分子生物学研究. E-mail: yfeng@ jlu. edu. cn

从晶体结构方面看,可将 PH1704 与 ATP 依赖性半胱氨酸蛋白酶博莱霉素水解酶(Gal6)<sup>[8]</sup>和亮氨酸氨肽酶(LAP)<sup>[9]</sup>划分为一族.虽然 PH1704 的六聚体只含有 3 个活性位点,但其三维结构与 Gal6 和 LAP 活性位点的类桶状区室化结构及 ATP 依赖性 20S 蛋白酶体、ClpP 和 Lon(图 1),以及 ATP 非依赖性三角肽酶(TRI)<sup>[10]</sup>、四面体氨肽酶(TET)<sup>[11]</sup>的结构极为相似.虽然 PH1704 和上述酶都具有水解酶 活力,但在其它方面不尽相关<sup>[12]</sup>.实验表明<sup>[1]</sup>, Lon 和 TET 是典型的别构酶.



Fig. 1 Structures of Lon(A) and PH1704(B)

本文从 PH1704 蛋白酶结构与活性的关系出发,利用前线轨道理论,对 PH1704 进行分子轨道计算,以确定别构中心关键氨基酸残基,并通过分子生物学实验对其进行定点突变,探讨别构位点关键 残基对酶活力的影响.

## 1 实验部分

#### 1.1 材料、试剂与仪器

携带 Pyrococcus horikoshii OT3 半胱氨酸蛋白酶(PH1704)基因的载体 pET15b 由本实验室提供,大肠杆菌 BLP-CodonPlus 为 Invitrogen 公司产品,引物合成和测序由大连宝生物工程有限公司完成(大连,中国).限制性内切酶、T4DNA 连接酶、Klenow 酶及琼脂糖均购自 Boehringer Mannheim 公司;异丙基β-D-硫代半乳糖苷酶(IPTG)、丙烯酰胺及亚甲双丙烯酰胺均为 Sigma 公司产品. L-丙氨酸-丙氨酸-苯丙 氨酸-7-氨基-香豆素(L-AAFR-AMC)购自 Sigma 公司,其它试剂均为国产分析纯.基因脉冲导入仪 (MicroPulser)购自北京元业伯乐科技发展有限公司;UV-557 型紫外-可见分光光度计和 RF-5301PC 荧 光分光光度计均购自日本岛津公司.

#### 1.2 理论计算

1.2.1 同源模建与分子对接 同源模建技术是目前最常用的预测蛋白质三维结构的方法<sup>[13,14]</sup>,其以 PH1704 嗜热蛋白酶的晶体结构(PDB: 1G2I)<sup>[5]</sup>为模板,将同源性高于 60% 的同家族蛋白搭建成可靠 的嗜热蛋白酶模型.采用 AutoDock Vina 软件<sup>[15,16]</sup>进行分子对接.

1.2.2 PH1704 别构活性位点的量子化学计算 依据 PH1704 的晶体结构,在催化区域中截取了由 L112~A130 的18 个氨基酸残基组成的完整片段,并利用 Insight II 软件包中的 Homology 模块<sup>[23]</sup>,采用 同源建模的方法在 SGI 图形工作站上构建其三维结构,使之与其在别构区域的原始构象一致,并以此 构象为结构基础进行研究.在截取片段过程中,片段的 N 端为—NH<sub>2</sub>,C 端为—CONH<sub>2</sub>,均不带电荷, 这就使多肽片段的带电氨基酸数目与催化区中的数目一致,使计算结果更符合实际情况.采用 Material Studio 软件中的 Dmol<sup>3[17]</sup>模块,在 GGA/BLYP/DNP 水平下,以水为溶剂对构型进行优化.在优化的过程中,固定肽链,只对支链和无机分子进行完全优化.采用 B3LYP/6-31+G\*方法对优化结果进行单点

1.2.3 分子动力学模拟 GROMACS 是用于研究生物分子体系的分子动力学程序. 它采用分子动力学 及随机动力学模拟蛋白质,并可进行分子能量的最小化和构象分析等<sup>[20]</sup>.本文采用 GROMACS 力场及 TIP3P 水模型,对体系进行 10 ns 分子动力学模拟.

#### 1.3 实验方法

1.3.1 突变体的构建及表达纯化 结合文献[21,22]结果,根据 PH1704 蛋白酶的 DNA 序列,构建突 变体 113T/120P/129D. 以重组质粒 pET15b 为模板,采用全质粒酶链反应(PCR)方法进行扩增,采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物.将 PCR 产物转化到感受态 E. coli BL21 CodonPlus,平板过 夜,挑取单菌落置于液体培养基中,提取重组质粒并进行序列分析.

PH1704 及其突变体的诱导及表达方法见文献[3]. 于4 ℃,6000 r/min 离心收集菌体,并将其悬浮于 50 mmol/L Tris-HCl(pH=8.0)中,再在冰浴中超声裂菌,最后在 85 ℃下热处理 15 min,离心弃去 沉淀,上清液过 HiTrap Q Sepharose 柱,并经 Sephacryl S-200 分子筛柱层析,收集蛋白峰.蛋白部分经聚乙二醇 20000 超滤浓缩后,进行酶活力测定.

1.3.2 野生型酶和突变体酶的动力学 参照文献[15]方法测定酶活力.400 μL反应体系组成如下: 10 μL 酶, 20 μL L-AAFR-AMC(100 mmol/L, 20% DMSO), 370 μL Tris-HCl(pH=8.0, 50 mmol/L).将 反应液置于 85 ℃水浴加热 30 min,再将其取出放置于冰浴中1 h,采用荧光检测活力.激发波长 380 nm,发射波长 460 nm,狭缝宽度为5 nm/1.5 nm.

### 2 结果与讨论

#### 2.1 别构位点的确定

别构效应是指某种不直接涉及蛋白质活性的物质,其结合于蛋白质活性部位以外的其它部位(别构部位),引起蛋白质分子构象的变化,从而导致蛋白质活性改变的现象.大多数多亚基蛋白/酶都具有别构潜力,都是别构蛋白/酶.通常将影响寡聚体蛋白质活性的物质称为别构配体或别构效应物,并将该类物质作用于蛋白质的某些部位而引起亚基间的相互影响称为协同性.同时将抑制蛋白质活力的现象称为负协同性,起抑制作用的物质称为负效应物或别构抑制剂;将增加蛋白质活力的现象称为正协同性,起增强作用的物质称为正效应物或别构激活剂.

PH1704 晶体结构解析显示, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>通过 2 个盐桥与 Arg113 上的胍基相连, 通过水和 Asn129 形成氢键(图 2). 由图 2(B)可知, Arg113 及 Asn129 通过 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>和水分子结合, 且位置远离活性位点, 为 第 2 个活性中心. Cl<sup>-</sup>和 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>都带有负电荷, 因此推测 Cl<sup>-</sup>也可通过同样的方式与 Arg113 及 Asn129 相结合.



Fig. 2 Crystal structure of PH1704

(A)  $SO_4^2$ - binding mode in the crystal structure; (B) allosteric site(Arg113, Asn129) and catalytic site(Cys100, His101 and Glu474).

将 PH1704 野生型分离纯化后进行动力学模拟, 酶活数据经过曲线拟合(图 3)的结果不符合 Michaelis-Menten 方程, 而符合 Hill 方程.

别构酶的动力学拟合曲线符合 Hill 方程,并且以其参数,即 Hill 系数(h)为代表.由 Hill 方程

 $(v = \frac{v_{max}[S]}{K + [S]^{h}})$ 可知,当h=1时,物质为典型的米氏 酶;当h>1时,为别构酶,并具有正协同性,即亚 基之间存在相互促进作用,有利于酶的催化;相 反,当h<1时,物质为具有负协同性的别构酶.由 图 3 可见,PH1704 野生型是别构蛋白酶,其h值为 0.86,说明 PH1704 存在负协同效应,从而推测113 及 129 阴离子结合位点为别构抑制剂结合位点.

#### 2.2 PH1704 别构区活性位点的量子化学分析

量子化学分析常被用于确定别构位点的组成.



Fig. 3 Kinetic curve of wild type PH1704 with substrate AAFR-AMC

根据分子轨道理论,前线轨道(最高占据轨道HOMO和最低空轨道 LUMO)及其附近的分子轨道对生物活性影响最大,活性分子与生物大分子的相互作用主要发生在两者的前线分子轨道附近.由 PH1704的晶体结构可知,120位点位于螺旋与片层交界处,片段 L112~A130的氨基酸排列及空间结构见图4.



Fig. 4 Spacial structrue and orbital distribution of L112—A130 fragments

(A) Spacial structure of L112—A130; (B) HOMO orbital; (C) LUMO orbital.

L112 ~ A130 片段经量子化学计算后得到的前线轨道附近分子轨道的分布情况列于表 1. 由表 1 可 知,该片段中 Arg113 构成了 HOMO 附近占据轨道的主要成分,在与受体作用时提供电子,LUMO 附近 空轨道主要由 Tyr120 提供,在与受体作用时接受电子.由图 4 可以更直观地看出,HOMO 分布在 Arg113 的主链上,而 LUMO 分布在 Tyr120 的主链上.由于在作为共轭体系的苯环中,π电子作用产生 的共轭效应使苯环表面电子云密度平均化,苯环表面的游动电子云密度增加,从而使苯环等芳香环起 到重要的电性作用.虽然 Tyr120 不在别构抑制剂的结合位点上(见图 4),但 LUMO 轨道在 120 位点 上,这说明 120 位点反应活性较高,易与供电子基团结合.

Table 1 Molecular orbital distributions

Orbital	HOMO-3	HOMO-2	HOMO-1	НОМО	LUMO	LUMO+1	LUMO+2	LUMO+3
Energy level/eV	-3.8790	-3.6584	-3.6402	-3.1192	-2.9785	-2.8413	-2.6656	-2.5014
Main component	Asp126	Asp126	Asp125	Arg113	Tyr120	Arg115	Arg115	Gly114

由表1还可以看出,在与别构抑制剂结合时,该片段的 Arg113 是提供电子的主要部位,Tyr120 是 接受电子的主要部位,它们都是影响分子活性的重要氨基酸.另外,由构象图(图4)可见,Arg113 与 Tyr120 在空间排布上都是向外伸展的,这种构象使其在同别构抑制剂相互作用时处于有利的空间位 置.由此可见,Arg113,Tyr120 和 Asn129 为 PH1704 蛋白酶别构剂结合的主要残基位点.

#### 2.3 120 位点的作用

由晶体结构解析结果[图 2(B)]可见, PH1704 的催化三联体位于 A 和 C 亚基, 即 C100(A), H101(A), E474(C), H101 和 E474 间并以氢键相连, 三者形成电荷中继网. 亲核残基 Cys100 位于 "亲核肘"的急拐角处, 处于一个能量不利的位置, 但是一个典型的 α/β 水解酶的催化三联体. AC 亚

基的 α7 螺旋(124~129; 524~529)构成亚基交界面.进一步研究发现, Tyr120 主链的 NH 官能团与 Cys100 的 C = O 间形成氢键, Tyr120 骨架上的 C = O 官能团与 Ile123 间形成氢键. Ile123 位于重要的 α7 螺旋(124~129)附近, 而 Asn129 参与 Cl<sup>-</sup>的结合. 残基 120 正好处于活性位点(Cys100)和 AC 亚基 的界面 α7(124~129)附近.因此可推测残基 120 对于亚基的聚合起重要作用,可能会通过离子结合来 影响催化活性.

将底物 AAFR-AMC 与 PH1704 对接以证明 Tyr120 的重要性. 从图 5 可以看出, AAFR-AMC 正好处 于活性口袋当中, 底物 AAFR-AMC 和 PH1704 结合时的 10 个残基, 即 Glu12, Lys43, His44, His101, Tyr120, Val150, Pro151, Arg471, Glu474 和 Arg475 与文献[5]报道的活性位点的重要残基相同, 说明 AAFR-AMC 的结合位置合理. PH1704 晶体结构解析(图 2)显示, Cys100 主链上的 N 原子与 Tyr120 主 链上的 O 原子之间形成氢键, 说明 Tyr120 距离 Cys100 位点较近, 并通过氢键影响酶的亲核催化.





(A) AAFR-AMC in the active pocket of PH1704; (B) important residues in the binding of AAFR-AMC and PH1704.

为进一步探讨突变体对催化残基的影响, 对野生型(WT)酶和突变体酶进行 10 ns 的分 子动力学模拟. 由图 6 可见,野生型酶与底物 复合物虽然在 2 ns 左右就已经平衡,但是复合 物(PH1704-AAFR-AMC)的 Cα 的均方根偏差 (RMSD)保持在 3 nm 左右,而突变体的复合物 的 RMSD 则保持在 1.5 nm 左右,说明突变体 复合物的体系更稳定,更有利于化学反应的 发生.

经过 10 ns 动力学模拟发现,催化残基 His101 和 Glu474 间氢键的形成几率有明显变



Fig. 6 Cα RMSD plot of complex PH1704-AAFR-AMC



化. 氢键形成几率由 WT 中的 43.9% 增加为突变体 R113T/Y120P/N129D 中的 66.7%,从而更利于催 化三联体间的电荷传递及 Cys100 的亲核进攻.

由多重序列比对图(图7)可见,120 位点的残基基本都是 Tyr,此位点在 DJ-1 超家族中较保守.以 PH1704 的晶体结构(PDB ID: 1G2I)为模板,采用 Swiss model 构建出其余 4 种蛋白酶六聚体的 3D 结构(同源性高于 60%).对 4 种蛋白结构进行评估,结果如表 2 所示.可以看出,由于与 PH1704 序列 同源性均较高(最低为 61%),所构建的 4 种蛋白的结构是可靠的.

将底物 AAFR-AMC 与 3L18, PfpI, NA2 及 GE5 等 4 种蛋白分别进行分子对接. 结果发现, 对接能量十分相近, 分别为-28.006, -27.588, -27.170 和-25.707 kJ/mol. 分子对接结果见图 8. 可见, 120 位点都位于亚基交界面的底物结合口袋处.

从4种构建的蛋白酶的结构来看,120位点都处于A、C两个亚基的交界面附近的底物结合口袋处,4种蛋白都可以形成六聚体的空间结构,基本与Cha等<sup>[7]</sup>的观点一致,即YhbO类型的六聚体才具有蛋白酶的活力.



Fig. 7 Sequence alignment of PH1704 with other members in the DJ-1 superfamily

PfpI, *Pyrococcus furiosus* protease I(90.4%, percentage identity); NA2, an intracellular protease from *Pyrococcus sp.* NA2(88%); GE5, an intracellular protease from *Pyrococcus abyssi* GE5(86%); EJ3, an intracellular protease from *Thermococcus gammatolerans* EJ3(85.0%); 3L18, an intracellular protease from *Thermococcus onnurineus* NA1(78%); YP372, an intracellular protease from *Methanohalobium evestigatum* Z-7303(61%). According to the decending order, the homology levels are highlighted by dark blue, pink and sky blue, respectively.

Protein		Errat score			
PfpI	Core(90.2)	Allow(9.1)	Gener(0.0)	Disall(0.8)	97.046
NA2	Core(89.4)	Allow(9.2)	Gener(0.7)	Disall(0.7)	92.194
GE5	Core(88.0)	Allow(10.6)	Gener(0.7)	Disall(0.7)	94.515
3L18	Core(88.8)	Allow(9.8)	Gener(0.7)	Disall(0.7)	98.301

According to of mustain structure





(A) 3L18; (B) PfpI; (C) NA2; (D) GE5.

综上, 残基 Tyr120 距离 Cys100 和 A、C 亚基的界面 α7(124~129)较近, 并通过阴离子和水分子 的共同作用与 Arg113 和 Asn129 形成封闭环, 因此可推测残基 120 对于亚基的聚合起重要作用, 并间 接参与 PH1704 的别构调控.

#### 2.4 野生型酶和突变体酶的纯化与酶活力检测

在上述理论分析的基础上,选定113,120和129位点,采用Kuhlman课题组<sup>[16]</sup>开发的在线蛋白设 计程序,即Rosseta design进行研究.其设计基于蛋白质折叠的原理,可提高现有蛋白质的稳定性,增 加酶和配体之间的结合亲和力.结合Rosseta design程序设计,最后得到113T/120P/129D的最优突 变体.

依据分子生物学定点突变方法,构建 113T/120P/129D 突变体.野生型酶和突变体酶经过超声破 碎、热失活、HiTrap Q Sepharose 柱纯化和 Sephacryl S-200 分子筛纯化后,得到分子量为 2×10<sup>5</sup> 的十二 聚体.以 AAFR-AMC 为荧光底物,对 PH1704 及突变体进行酶活力检测,结果如表 3 所示.野生型酶 和突变体酶动力学数据经过曲线拟合均符合 Hill 方程,说明它们都是别构酶.Tyr120 位于亚基交界面 的底物结合口袋,且与亲核残基 Cys100 间以氢键相连,所以这 3 个位点的突变体会影响亚基间的聚

Enzyme	$k_{\rm cat}/{\rm min}^{-1}$	$k_{\rm m}/(\mu{ m mol}\cdot{ m L}^{-1})$	h	$(k_{\rm cat}/k_{\rm m})/(L \cdot \mu { m mol}^{-1} \cdot { m min}^{-1})$
WT	0.11	10	0.86	0.01
R113T/Y120P/N129D	0.79	13.05	1.3	0.06

 Table 3
 Kinetic parameters for hydrolysis substrates of AAFR-AMC

合,从而影响催化三联体的形成和酶的活力.又因为突变体位于底物结合口袋处,所以还会影响底物 的亲和力.这3个位点参与阴离子别构剂的结合,其位点突变体会影响酶的协同性.

对于突变体 113T/120P/129D, 阴离子别构剂从别构中心 113 和 129 位点脱离, 致使别构抑制作用 消失, 进而使负协同效应消失, h 系数由野生型酶的 0.86 转变为 1.3; 因 120 位点残基由 Tyr120 转变 成 Pro120, 与亲核残基 Cys100 间的氢键断开, 一方面影响亚基交界面的聚合度及催化三联体的形成; 另一方面对亲核残基 Cys100 亲核进攻的牵制力减小. 这都会影响酶的亲核进攻, 从而使突变体酶活力 提高 6 倍; 突变体酶 k<sub>cat</sub>为 0.79 min<sup>-1</sup>, 明显高于野生型酶的 0.11 min<sup>-1</sup>, 原因可能在于, 封闭环被打 开, 113 和 129 位点的柔性增强, 120 位点的侧链官能团减小, 从而有利于底物结合口袋构象的正确折 叠, 所以酶分子的催化效率得到提高.

#### 3 结 论

基于量子化学计算及分子对接,确定了 PH1704 别构中心的重要残基为 Arg113, Tyr120 和 Asn129; 120 位点位于 A 和 C 亚基交界面,并与亲核残基 Cys100 间形成氢键,通过影响亚基聚合的紧密度和亲核进攻的空间位阻来影响催化三联体的形成,进而改变蛋白酶的活力.分子生物学实验结果表明,120 位点直接参与亲核催化,间接参与别构调控.通过量子化学计算,对嗜热蛋白酶分子进行别构位点预测,为 DJ-1 超家族别构机制的进一步深入研究提供有利依据.

#### 参考文献

- [1] Wei Y., Ringe D., Wilson M. A., Plos. Comput. Biol., 2007, 3(1), 120-126
- [2] Zhan D. L., Han W. W., Feng Y., J. Mol. Model, 2011, 17, 1241-1249
- [3] Zhan D. L., Gao N., Han W. W., Feng Y., Chem. J. Chinese Universities, 2013, 34(3), 628—633(詹冬玲, 高楠, 韩葳葳, 冯 雁. 高等学校化学学报, 2013, 34(3), 628—633)
- Bonifati V., Rizzu P., Baren M. J., Schaap O., Breedveld G. J., Krieger E., Marieke C. J. D., Squitieri F., Ibanez P., Joosse M., Jeroen W. V. D., Vanacore N., John C. V. S., Brice A., Meco G., Cornelia M. V. D., Ben A. O., Heutink P., Science, 2003, 299, 256–259
- [5] Du X. L., Choi I. G., Kim R., Wang W., Jancarik J., Yokota H., Kin S. H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97, 14079-14084
- [6] Ollis D. L., Cheah E., Cygler M., Dijkstra B., Frolow F., Franken S. M., Harel M., Remington S. J., Silman I., Schrag J., Sussman J. L., Verschueren K. H. G., Goldman A., Protein Eng., 1992, 5, 197–211
- [7] Cha S. S., Jung H., Jeon H., Kim I. K., Yun S., Ahn H. J., Chung K. C., Lee S. H., Suh P. G., Kang S. O., J. Biol. Chem., 2008, 283, 34069—34075
- [8] Shendelman S., Jonason A., Martinat C., Plos Biol., 2004, 2, 1764-1773
- [9] Kim R. H., Peters M., Jang Y. J., Shi W., Pintilie M., Fletcher G. C., Deluca C., Liepa J., Zhou L., Snow B., Binari R. C., Manoukian A. S., Bray M. R., Liu F. F., Tsao M. S., Mak T. W., *Cancer Cell*, 2005, 3(7), 263–273
- [10] Niki T., Takahashi N. K., Taira T., Iguchi-Ariga S. M., Ariga H., Mol. Cancer Res., 2003, 1, 247-261
- [11] Wilson M. A., Collins J. L., Hod Y., Ringe D., Petsko G. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100, 9256-9261
- [12] Wilson M. A., Ringe D., Petsko G. A., J. Mol. Biol., 2005, 353, 678-691
- [13] Han W. W., Zhan D. L., Xi Z., Chem. Res. Chinese Universities, 2010, 26(1), 128-135
- [14] Han W. W., Wang Y., Luo Q., Feng Y., J. Theor. Comput. Chem., 2011, 10, 165-177
- [15] Trott O., Arthur J. O., J. Comput. Chem., 2010, 31, 455-461
- [16] Sammond D. W., Elelr Z. M., Purbeck C., Kuhlman B., Proteins, 2001, 78, 1055-1065
- [17] Delley B., J. Chem. Phys., 2000, 113, 7756-7764
- [18] Cervantes-Navarro F., Glossman-Mitnik D., Chem. Cent. J., 2012, 6, 70-75
- [19] Han W. W., Wang Y., Zhou Y. H., Yao Y., Li Z. S., Feng Y., J. Mol. Model., 2009, 15, 481-487
- [20] Zhan D. L., Zhang Y., Song Y. W., Sun Y., Li Z. S., Han W. W., Liu J. S., J. Theor. Comput. Chem., 2012, 11, 1101–1120
  [21] Jacobs T. M., Kuhlman B., Biochem. Soc. Trans., 2013, 41(5), 1141–1145
- [22] Drew K., Renfrew P. D., Craven T. W., Butterfoss G. L., Chou F. C., Lyskov S., Bullock B. N., Watkins A., Labonte J. W.,
- Pacella M., Kilambi K. P., Leaver-Fay A., Kuhlman B., Gray J. J., Bradley P., Kirshenbaum K., Arora P. S., Das R., Bonneau R., *PLoSOne*, **2013**, 8(7), e67051-1–e67051-17

Han W. W., Zhou Y. H., Yao Y., Li Z. S., J. Mol. Struct. (TheoChem.), 2007, 815, 87-93 [23]

# Quantum Chemistry Calculation of Thermophilic Protease PH1704 Allosteric Center and Mutant Dynamics<sup>†</sup>

ZHAN Dongling<sup>1,2</sup>, GAO Nan<sup>3</sup>, HAN Weiwei<sup>1\*</sup>, FENG Yan<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory for Molecular Enzymology and Engineering, Ministry of Education,

Jilin University, Changchun 130012, China;

2. College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

3. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences,

Changchun 130022, China)

The PH1704 allosteric sites were studied with the quantum chemistry analysis and the crystal struc-Abstract ture analysis. The results show that key residues are Arg113, Tyr120 and Asn129. Tyr120 is connected with nucleophilic residues Cys100 by a hydrogen bond, participates in enzyme nucleophilic catalyst, and is validated by fixed-point mutation of molecular biology experiments. The structures of four building protein of DJ-1 superfamily show that the 120 site locates in the substrate binding pocket in the subunit interface and affects the enzyme activity of the protein. The  $k_{cat}/k_{m}(L \cdot \mu mol^{-1} \cdot min^{-1})$  value of mutant R113T/Y120P/N129D is six times higher than that of the wild-type and the Hill coefficient changes from 0.86 (wild type) to 1.3 with negative cooperativity disappearing. The main reason is that the residue of 120 site changes from Tyr to Pro, and the hydrogen bonds between Tyr120 and Cys100 are broken, thus its nucleophilic attacking resis-tance decreases, which causes the enzyme activity to increase. The mutations of 113 and 129 sites lead to the detachment of the anionic allosteric agent, thus the negative cooperativity disappears. This work predictes the allosteric site of thermophilic protease by quantum chemistry and crystal structure analysis and provides a solid foundation for further research on the allosteric enzyme of DJ-1 superfamily.

Thermophilic protease; Quantum chemistry calculation; Allosteric center; Site-mutant Keywords

(Ed. : Y, Z, A)