

研究论文

DOI: 10.12211/2096-8280.2021-016

创制非天然辅酶偏好型甲醇脱氢酶

王俊婷^{1,2}, 郭潇佳¹, 李青^{1,2}, 万里^{1,2}, 赵宗保¹⁽¹⁾ 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023; ⁽²⁾ 中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 有机一碳化合物甲醇是未来生物炼制产业的重要原料。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 依赖型甲醇脱氢酶 (MDH) 可催化甲醇氧化合成甲醛为代谢提供碳源, 同时生成化学计量的 NADH, 为代谢提供还原力。改造 MDH 的辅酶结合口袋, 获得偏好非天然辅酶烟酰胺胞嘧啶二核苷酸 (NCD) 的突变体, 可用甲醇作为碳源并产生 NCDH, 为特定代谢途径提供还原力。本文首先分析嗜热脂肪芽孢杆菌 *Bacillus stearothermophilus* DSM2334 来源 NAD 依赖型 MDH 的结构, 通过虚拟筛选和单位点突变文库初筛, 鉴别出辅酶结合敏感位点, 进一步依据缩小辅酶结合空腔的预期, 构建并筛选得到有效利用 NCD 的突变体。在大肠杆菌中过表达并纯化各突变体, 进行酶催化动力学分析, 结果表明突变体 MDH 9D1 以 NCD 为辅酶时催化效率达 858 L/(mol·s), 其 NCD 偏好性相对于野生型蛋白提高了 13 000 倍。研究结果为甲醇利用及新型氧化还原代谢途径构建提供了新的功能元件。

关键词: 甲醇脱氢酶; 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸; 非天然辅酶; 生物催化; 文库筛选

中图分类号: Q55 **文献标志码:** A

Creation of non-natural cofactor-dependent methanol dehydrogenase

WANG Junting^{1,2}, GUO Xiaojia¹, LI Qing^{1,2}, WAN Li^{1,2}, ZHAO Zongbao¹⁽¹⁾ Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, Liaoning, China; ⁽²⁾ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: The C1 organic carbon compound methanol is a potential raw material for biorefinery. Recently, intensive efforts have been devoted to engineer cell factories for direct conversion of methanol into valuable metabolites. The oxidation of methanol into formaldehyde is the first committed step to provide useful substance for metabolism. While some methylotrophic microorganisms oxidize methanol with hydrogen peroxide as a co-product, many engineered systems are designed to co-produce NADH, the reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NAD). The later route, normally catalyzed by NAD-dependent methanol dehydrogenase (MDH), is more attractive as NADH can be used as reducing power for cellular metabolism. However, NAD(H) are used by many redox enzymes and methanol oxidation-derived NADH can cause unpredictable biological effects. We recently engineered the cofactor preference of several

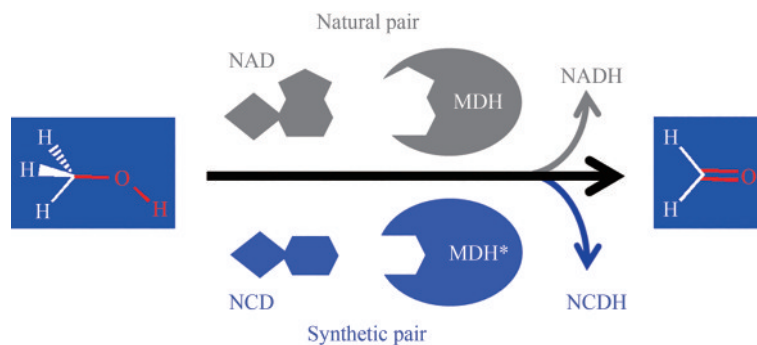
收稿日期: 2021-02-04 修回日期: 2021-03-16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (21877112; 21721004)

引用本文: 王俊婷, 郭潇佳, 李青, 万里, 赵宗保. 创制非天然辅酶偏好型甲醇脱氢酶[J]. 合成生物学, 2021, 2(4): 651-661

Citation: WANG Junting, GUO Xiaojia, LI Qing, WAN Li, ZHAO Zongbao. Creation of non-natural cofactor-dependent methanol dehydrogenase[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(4): 651-661

NAD-dependent redox enzymes to favor a non-natural cofactor nicotinamide cytosine dinucleotide (NCD). By coupling these enzymes we demonstrated the construction of NCD-linked redox systems orthogonal to the natural cofactor NAD(H), which could be used for pathway-selective chemical energy transfer in *Escherichia coli*. By redesigning the cofactor binding pocket of MDH, it is possible to obtain mutants favoring NCD, and thus utilize methanol as a carbon source with co-producing reduced NCD for dedicated redox chemistry. In this paper, we first analyzed the cofactor-binding pocket of *Bacillus stearothermophilus* DSM2334 derived NAD-dependent MDH (UniProt: P42327.1). Through virtual screening and single-site mutation library screening, hot spots for cofactor binding were identified. More mutants were rationally generated based on insights into the volume of cofactor binding cavity and those were obtained with improved activities in the presence of NCD. The mutants were overexpressed in *E. coli*, purified, and their catalytic performance were analyzed. The results showed that the catalytic efficiency of the mutant 9D1 (MDH Y171R/I196V/V237T/N240E/K241A) with NCD reached 858 L/(mol·s), and its NCD preference was 13 000-fold higher than that of the wild-type protein. These MDH variants can be considered as new functional parts for the bioconversion of methanol and the construction of new redox metabolism.



Keywords: methanol dehydrogenase; nicotinamide adenosine dinucleotide; non-natural cofactor; biocatalysis; library screening

甲醇是大宗有机一碳化合物，全球年产量达6000万吨，有望成为未来生物炼制产业的重要原料^[1-2]。煤、天然气、页岩气和CO₂等通过化学法可规模化制备甲醇，而在废物处理和垃圾填埋场中，厌氧消化产生的甲烷和合成气，也可进一步转化为甲醇^[3]。通过改造甲基营养型微生物或重建甲基利用途径，构建了一系列以甲醇为原料的微生物细胞工厂^[4-5]。甲醇氧化酶将甲醇氧化为甲醛为代谢提供碳源，同时产生过氧化氢，后者需要消耗额外能量予以清除^[6]。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD，图1）依赖型甲醇脱氢酶（MDH）也可氧化甲醇合成甲醛，同时生成化学计量的NADH可作为代谢的还原力^[7]。来源于嗜热脂肪芽孢杆菌 *Bacillus stearothermophilus* DSM2334 的 NAD 依赖型 MDH (*BsMDH*, UniProt: P42327.1)

对甲醇亲和力较高^[8]， K_m 为20 mmol/L^[7]。目前文献中研究较多的NAD依赖型MDH包括*BsMDH*和*Bacillus methanolicus* (*BmMDH*)^[6]，而*BmMDH*对甲醇的 K_m 为132 mmol/L^[1, 9]，其对甲醇的亲和力比*BsMDH*更低。除此之外，还有来源于谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 的MDH的 K_m 也在97 mmol/L左右；来源于钩虫贪铜菌 *Cupriavidus necator* N-1 的MDH与*BmMDH*相似，对甲醇的亲和力在132 mmol/L左右，且对ACT不敏感；来源于解木糖赖氨酸芽孢杆菌 *Lysinibacillus xylanilyticus* 的MDH的 K_m 在3 mmol/L左右，虽然对甲醇的亲和力相对较高，但其最适反应条件为pH9.5和55 °C，不符合大肠杆菌的最适生长条件^[10]。研究表明，*BsMDH*易于在大肠杆菌中过量表达，已成功用于构建利用甲醇的工程菌株^[11-12]

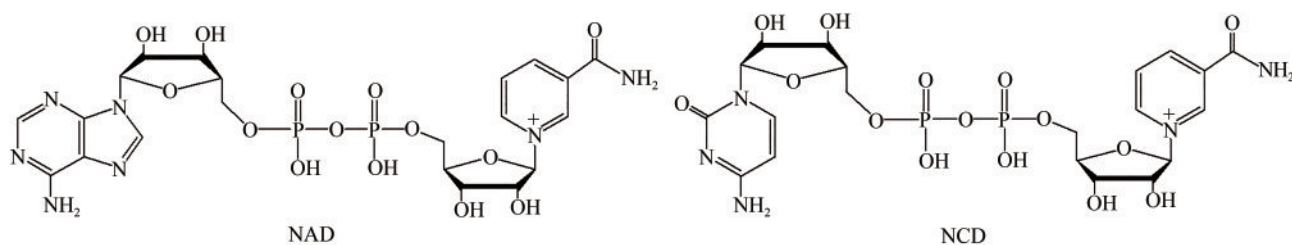


图1 NAD及NCD的结构

Fig. 1 Structures of NAD and NCD

或基于甲醇的胞外氧化还原体系^[13]。

NAD及其还原型NADH是胞内重要的辅因子，广泛参与氧化还原代谢反应^[14]。NAD(H)还可以参与其他生物学过程如细胞繁殖、生长、分化和凋亡等^[15]。调控胞内NAD(H)水平是代谢工程及合成生物研究中改善宿主性能的常用手段，获得过大量成功案例^[16]。然而，NAD(H)水平扰动可对胞内代谢反应产生复杂且难以预测的影响^[17-18]。利用NAD类似物，可提高催化效率、促进辅因子循环再生或提高生物催化反应^[19-20]。虽然一些结构简化的NAD类似物可用于体外酶催化，但在胞内应用需特别考虑生物兼容性，如氧化还原电位、溶解性以及结构单元是否易于生物合成等^[21]。此外，也有研究尝试将NAD生物合成前体如烟酰胺单核苷酸(NMN)和化学修饰的NAD类似物用做非天然氧化还原辅酶^[22-23]。本课题组早期合成了一系列具有生物活性的NAD类似物^[24-26]，其中烟酰胺胞嘧啶二核苷酸(NCD，图1)与NAD在结构上存在一个碱基差异。以NAD依赖型苹果酸酶为模型，改造筛选获得了系列偏好NCD的苹果酸酶突变体^[27]，通过改造亚磷酸脱氢酶和甲酸脱氢酶的辅酶结合口袋，均得到了偏好NCD的突变体，并成功构建了NCD介导的、正交于内源氧化还原辅酶的代谢线路^[28-29]。最近，也有研究尝试构建基于NMN^[30]及其他烟酰胺衍生物^[21]的氧化还原催化体系，并取得了有价值的成果^[31]。这些研究不断丰富氧化还原催化元件，对合成生物学领域发展具有重要意义。

本研究的目的是改造*BsMDH*的辅酶结合口袋，筛选获得偏好NCD的突变体，为构建利用甲醇的新型氧化还原催化体系及微生物细胞工厂提供功能元件。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

构建文库及蛋白质表达及纯化时所用宿主为大肠杆菌BL21(DE3)。密码子优化的*BsMDH*编码基因^[8]由Synbio Technologies合成，并已克隆在表达质粒pTrc99K-MDH^[32]。

1.1.2 培养基

LB培养基：氯化钠 10 g/L，胰蛋白胨 10 g/L，酵母提取物 5 g/L。

TB培养基：胰蛋白胨 12 g/L，酵母提取物 24 g/L，甘油 4 mL/L，磷酸二氢钾 0.017 mol/L，磷酸氢二钾 0.072 mol/L。

1.1.3 主要试剂和仪器

试剂：NBT(硝基四氮唑蓝)、PMS(酚嗪硫酸甲酯)、溶菌酶、MTT(噻唑蓝)、PES(酚嗪硫酸乙酯)、NAD等购自北京鼎国昌盛生物技术公司。NCD由本实验室合成^[6]。

仪器：全波长酶标扫描仪(PowerWave XS, Bio-Tek Instruments Inc., USA); 蛋白结构模拟工具Swiss model和MOE(CCG, Montreal, Canada); 高通量细胞培养与活性分析系统(Beckman)。

1.2 文库构建及筛选

1.2.1 结构模拟及分子对接

以序列相似度58%的醇脱氢酶(PDB ID: 3s2e)的晶体结构为模板，用蛋白质结构同源性模型服务器(SWISS-MODEL)模拟*BsMDH*的结构^[33]，用软件PyMOL分析结构确定突变氨基酸残基的空间位置并作图^[34]。用MOE进行分子对接和结构分析。分子对接：*BsMDH*为受体，NCD为配

体, NAD空腔为配体结合位点, 对接选择默认方法, 其中放置方法为Triangle Matcher, 优化方法为Rigid Receptor, 打分方法为London dG和GbBVI/WSA dG, pose值分别设置为300和50, 虚拟筛选设计方法选择Residue Scan, 筛选方法选择LowMode, 突变位点选择1个。

突变体的分子对接利用MOE进行, 分别将BsMDH、突变体3-1和9D1与NAD和NCD对接。首先利用BsMDH的晶体结构(PDB: 6IQD)对接NAD和NCD。参照来源于*Pseudomonas aeruginosa*的醇脱氢酶(PDB: 1LLU)中NAD的结合区域, 对接BsMDH和NAD、NCD, 配体放置方法为Triangle Matcher, 优化方法为Rigid Receptor, 打分方法为London dG和GbBVI/WSA dG, pose值分别设置为100和20。对于突变体, 首先利用SWISS-MODEL对突变体3-1和9D1建模, 然后按照类似的方法与NAD和NCD对接。

1.2.2 突变位点选择

基于NCD与NAD的结构差异, 推测通过改变氧化还原酶NAD腺嘌呤结合空腔大小来实现辅酶偏好性的改变, 选择辅酶腺嘌呤0.8 nm范围内的氨基酸残基, 进行单独或组合突变。

1.2.3 文库构建

利用96孔板的筛选技术构建饱和突变文库^[35], 由于密码子的简并性, 选择NNK(N为A, G, T, C; K为G, T)代替原来的3个碱基覆盖所有可能的氨基酸, 即用32个密码子可代表20种氨基酸。使用不依赖于限制性内切酶的克隆(RF克隆)方法^[36]构建文库, 对于单位点突变, 设计具有简并密码子NNK的引物, 然后进行RF克隆; 对于多位点突变, 首先扩增具有简并密码子的片段, 然后进行RF克隆。构建文库时, 以携带野生型MDH的质粒用作模板, 将PCR产物在37 °C用DpnI处理2 h, 然后将其转化进大肠杆菌BL21(DE3)细胞中, 待转化子长出。

1.2.4 文库筛选

为提高获得最优结果的概率, 构建在每个位点都覆盖所有氨基酸的突变体文库, 然后进行筛选^[37-38]。利用NBT-PMS偶联方法, 根据570 nm光吸收变化测定甲醇脱氢酶的活性^[39-40]。按文献方法估算拟筛选的转化子数目^[41], 保证覆盖相应文

库理论值的95%。

初筛在96孔板(每孔400 μL培养液), 复筛在24孔板(每孔2.5 mL菌液), 25 °C培养48 h; 离心去上清, 每孔加入细胞裂解液100 μL, 在-80 °C冻17~18 h, 然后37 °C裂解2 h。显色体系为HEPES(pH7.5) 50 mmol/L, 异丙醇13 mmol/L或甲醇50 mmol/L, NBT 100 μmol/L, PMS 30 μmol/L, 上清液10 μL。显色时, 初筛体系中添加NCD, 复筛时设置2个体系, 分别加NCD和NAD。辅酶浓度在0.1 mmol/L以上, 根据文库及活性情况而调整。

1.2.5 粗酶活测定

取上清粗酶液10 μL, 在酶标板上分别进行与NAD和NCD的反应, 在570 nm下测定光密度变化^[28]。测定结果以每分钟光密度的变化表示粗酶活(mOD₅₇₀/min)。每个样品3个平行。体系为HEPES(pH7.5) 50 mmol/L, NAD、NCD的浓度根据酶对辅因子的活性而调整, 异丙醇13 mmol/L或甲醇50 mmol/L, MTT 400 μmol/L, PES 1 mmol/L, 粗酶液10 μL。鉴于MDH以异丙醇为底物时催化活性更高^[32], 在MDH活性筛选时, 均首先以异丙醇为底物, 再以甲醇进行复筛和验证。

1.3 动力学测定

1.3.1 蛋白纯化

突变体用LB培养, WT用TB培养, 添加50 μg/mL卡那霉素, 9D1添加0.05 mmol/L IPTG, 3-1及其他突变体都添加0.1 mmol/L IPTG。纯化(采用Invitrogen的Ni-NTA纯化系统)时, 菌体加入NBB缓冲液(50 mmol/L NaH₂PO₄, 0.5 mol/L NaCl, pH8.0)超声破碎, 14 000 r/min离心30 min, 上清液移到再生好的柱中, 过夜静置结合, 用NWB缓冲液洗出杂蛋白, NEB缓冲液(50 mmol/L NaH₂PO₄, 0.5 mol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, pH8.0)洗出目的蛋白, 将目的蛋白洗脱液用10 kDa超滤管超滤浓缩, 保存在20%甘油中, -80 °C保存。

1.3.2 酶动力学测定

酶循环法测定MDH突变体的动力学, 检测条件为25 °C, 检测波长570 nm^[40]。酶活测定体系: HEPES(pH7.5) 50 mmol/L, 甲醇800 mmol/L, MTT 400 μmol/L, PES 1 mmol/L, NAD或NCD的

浓度呈梯度变化, 加超纯水至 100 μL , 每个样品 3 个平行。分别将各酶稀释不同的倍数用于 NAD 或 NCD 检测^[28]。利用 Origin8.5 拟合米氏方程。根据 $k_{\text{cat}} = V_m/[E]$ ($[E]$ 为酶浓度) 计算 k_{cat} 。

酶活力单位定义为每分钟产生 1 μmol NADH 或 NCDH 所需的酶量。比酶活按以下公式计算:

比酶活 (specific activity, U/mg) =

$$\frac{\text{酶活}(\text{mOD}_{570}/\text{min}) \times 10^3 \times V_t}{16.2 LcV_s}$$

式中, V_t 为反应总体积, mL; L 为光程, cm; V_s 为加入酶的体积, mL; c 为反应体系中酶的浓度, mg/mL。

实验用酶标扫描仪测酶循环法产生的甲臆, 其消光系数为 16.2 L/(mmol·cm)。生成甲臆的量与产生的 NADH 或 NCDH 存在严格的计量关系。

2 结果与分析

2.1 虚拟筛选

分析 MDH 结构 [图 2 (a)], NAD 腺嘌呤 0.8 nm 范围内氨基酸位点有 21 个, 分别是 I170、Y171、G172、I173、G174、V194、D195、I196、K200、L216、I235、S236、V237、A238、V239、N240、K241、K242、A243、F244、Q246。在筛选前, 先使用 MOE 软件进行了虚拟筛选 [图 2 (b)、(c)], 当 Δ Affinity 大于 0 时, 表明亲和力降低, 当 Δ Affinity 小于 0 时, 表明亲和力提高。其中对 NAD 亲和力下降的包括: G172、I196、V237、A238、V239、N240、A243; 而对 NCD 亲和力上升的包括 Y171、S197、K200、V237、A238、N240、K242、A243、F244。显然, V237、A238、N240 和 A243 可能在降低对 NAD 亲和力的同时, 提升对 NCD 的亲和力。

2.2 文库构建及筛选

对 MDH 位点的选择主要依赖于分析晶体结构中氨基酸残基与 NAD 腺嘌呤的空间相对位置^[42], 再结合晶体中氨基酸残基与 NAD 腺嘌呤相互作用

分析, 采用迭代饱和突变和组合突变等方法对突变文库进行半理性设计^[43-44]。

对 2.1 中所述位点进行饱和突变, 按照流程 [图 3 (a)] 构建 11 个单位点文库及 4 个双位点文库, 从第 1 轮文库筛选中得到 4C1 和 3D2。经过测序, 4C1 携带 K242H/A243S 突变; 3D2 携带 V237T 突变。粗酶活结果 (图 3) 中, 以异丙醇为底物时 3D2 的 NCD/NAD 值提高了 2 倍, 而以甲醇为底物时提高了 50%。所得结果包括 V237 和 A243 位点突变, 与虚拟筛选结果相符。

继续以 4C1 和 3D2 为模板, 选取 NAD 腺嘌呤周围 0.8 nm 的其他位点, 构建突变体文库。然而以 4C1 为模板构建 3 个双位点文库和 11 个单位点文库, 并没有得到更偏好 NCD 的突变体; 而在以 3D2 为模板构建 3 个双位点文库和 10 个单位点文库时, 得到两个更好的突变体: 3F1 和 5D3。其中, 3F1 携带 V237T/N240E 突变, 5D3 携带 V237T/N240V 突变。粗酶活分析表明, 3F1 和 5D3 相比于 3D2, 其对 NAD 的活性降低了 50% [图 3 (b)、(c)]。3F1 和 5D3 均在相同位点突变, 表明 V237 和 N240 位点对于辅酶偏好性有重要贡献。

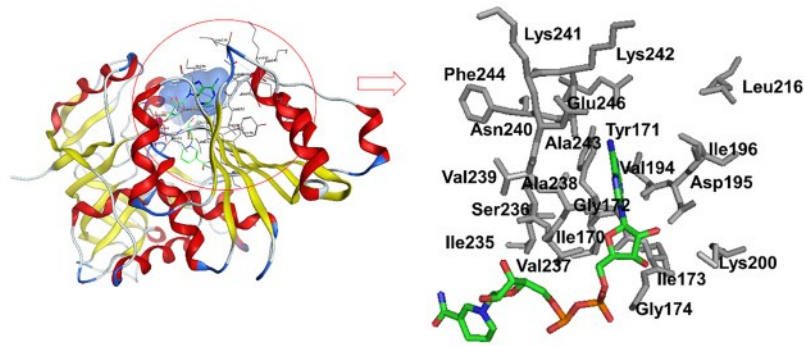
2.3 辅酶结合空腔改造

2.3.1 MDH 辅酶结合空腔结构分析

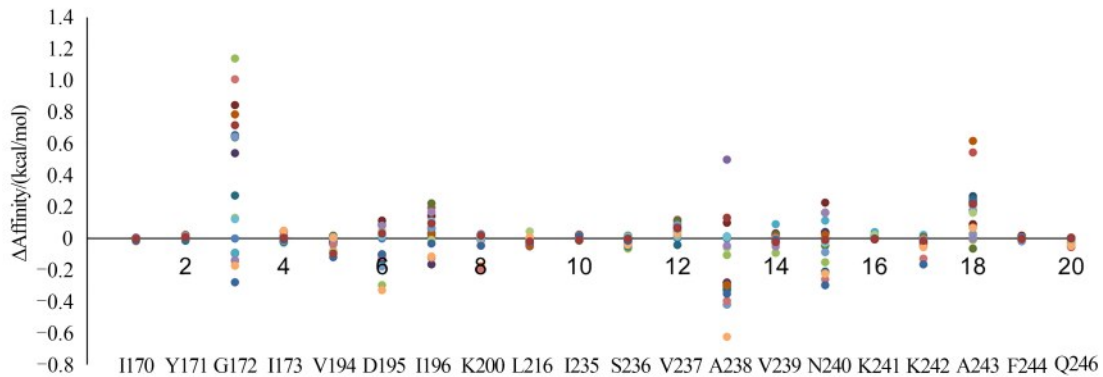
分析 MDH 的结构表明, V237 和 N240 分别处于 NAD 腺嘌呤平面的两个方向。鉴于 NAD 和 NCD 的重要区别在于腺嘌呤比胞嘧啶基团空间更大, 如果在腺嘌呤周围选择 3 个方向的位点进行突变, 就可能更好地改变辅酶结合空腔大小, 获得辅酶结合空腔缩小不利于 NAD 结合但适合 NCD 的突变体。通过分析 MDH 结构, 并根据已有筛选经验^[27], 推测第 3 个方向的位点可能是 Y171 或 I196。

2.3.2 单位点突变优化辅酶结合空腔

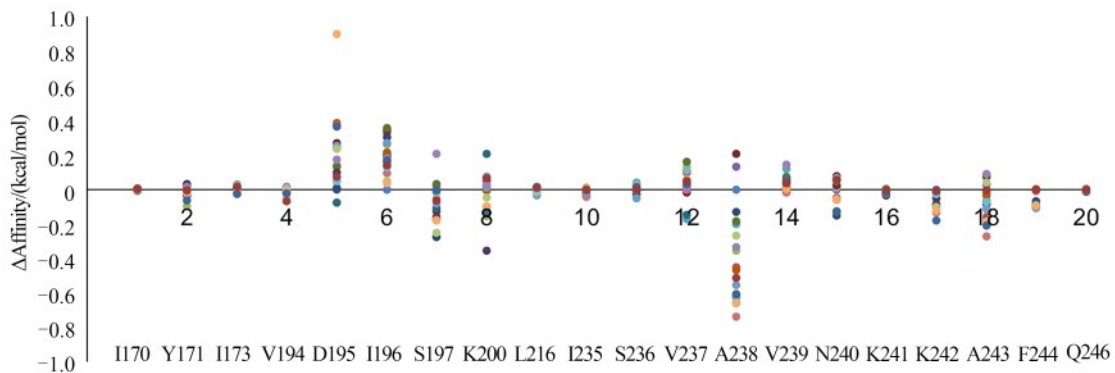
根据上述推测和筛选的初步结果, 基于位点 Y171、I196、V237 和 N240, 设计了 8 种 MDH 突变体, 即 1-1~1-4 和 2-1~2-4, 以引入体积相对较大、极性的氨基酸侧链 [图 4 (a)]。在大肠杆菌中表达这些突变体, 并分别以异丙醇和甲醇为底物, 以 NAD 和 NCD 为辅酶, 进行了粗酶活分析。结果发现, 除 1-3 外, 这些突变体与 WT 比利用



(a) *BsMDH*建模结构和NAD分子对接结果(与NAD的腺嘌呤部分相距0.8 nm的残基)
 (a) Structure of modeled *BsMDH* with NAD docked in cofactor binding pocket.
 Residues located within a distance of 0.8 nm to adenine moiety of NAD were indicated



(b) MDH单位点突变与NAD亲和力变化
 (b) Affinity changes for NAD binding of single site mutant compared to WT



(c) MDH单位点突变与NCD亲和力变化
 (c) Affinity changes for NCD binding of single site mutant compared to WT

图2 *BsMDH*结构模拟及辅酶结合性能虚拟筛选结果

Fig. 2 Structural modelling of MDH and virtual screening results with different cofactors

NAD和NCD的活性均降低到20%以下 [图4 (b)、(c)], 暗示所引入的突变可能导致辅酶结合空腔过于拥挤, 不利于NAD或NCD结合。因此, 选择具有大侧链的K241位点, 将其突变为侧链较小的丙氨酸A, 构建了5种组合突变, 即3-1、3-2、3-3、

3-4和3-5。幸运的是, 以异丙醇为底物时, 突变体3-1利用NCD的粗酶活显著高于其他突变体, 而利用NAD的粗酶活很低, 表现出明显的NCD偏好性 [图4 (b)]。以甲醇为底物时, 3-1利用NCD比NAD具有稍高的粗酶活。

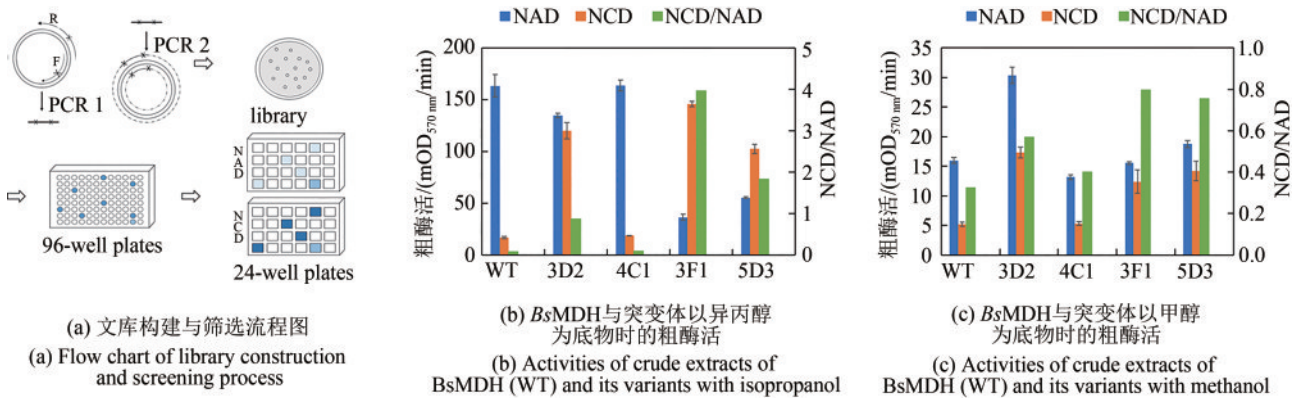


图3 文库筛选及粗酶活分析结果

Fig. 3 Library screening and activities of crude extracts

Mutant	Detailed mutation	Mutant	Detailed mutation
1-1	Y171R	2-4	Y171R/I196K/V237T/N240E
1-2	Y171R/I196R	3-1	Y171R/V237T/N240E/K241A
1-3	Y171R/I196E	3-2	Y171R/I196R/V237T/N240E/K241A
1-4	Y171R/I196K	3-3	Y171R/I196E/V237T/N240E/K241A
2-1	Y171R/V237T/N240E	3-4	Y171R/I196K/V237T/N240E/K241A
2-2	Y171R/I196R/V237T/N240E	3-5	V237T/N240E/K241A
2-3	Y171R/I196E/V237T/N240E		

(a) *BsMDH*突变位点

(a) Mutation information of *BsMDH* variants

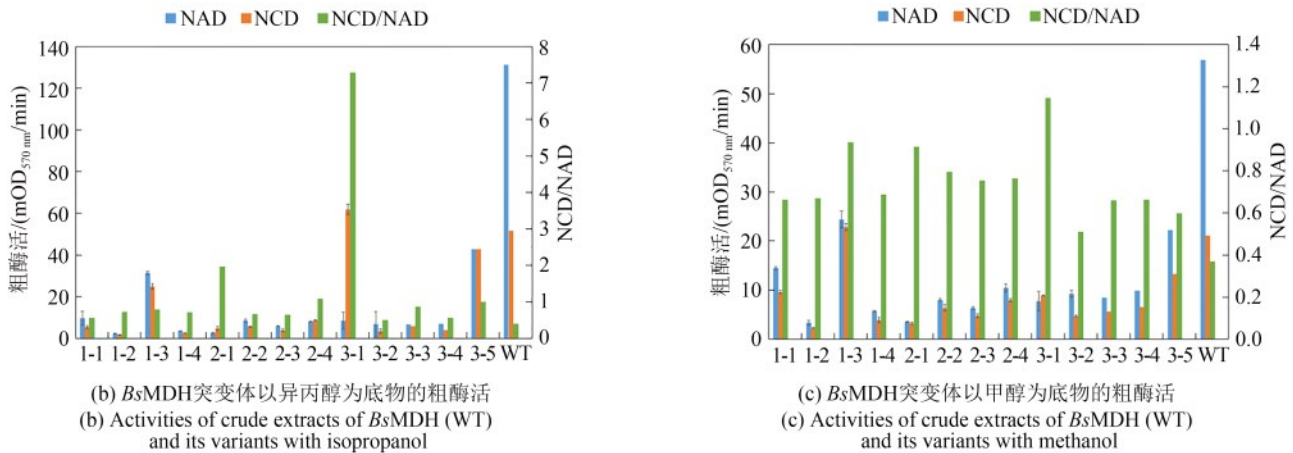


图4 *BsMDH*及突变体粗酶活分析结果

Fig. 4 Results of activity assay of crude extracts of *BsMDH* and its variants

虽然粗酶活分析表明突变体3-1已具有NCD偏好性，但其I196位点尚未优化。因此，以突变体3-1为模板，构建了I196饱和突变文库，筛选得到突变体9D1，其NCD/NAD粗酶活比进一步提高，而对NAD的活性显著降低。测序分析表明，9D1携带5个位点突变，即Y171R/I196V/V237T/N240E/K241A。

2.4 突变体的酶学性质

2.4.1 *BsMDH* 突变体偏好NCD

在大肠杆菌中表达MDH WT及突变体3D2、3F1、3-5、3-1和9D1，纯化得到重组蛋白。以甲醇为底物，分别以NAD和NCD为辅酶，分别进行酶催化反应动力学分析，实验数据见表1。

首先分析以NAD为辅酶的催化性能。除突变体3D2和3-5外,其他3个突变体比WT有更高的 K_m 值,表明其对NAD的亲合力降低;而所有突变体均比WT具有更低的 k_{cat} 值,表明突变体的催化速率下降。总体上,以NAD为辅酶时,突变体的催化效率(k_{cat}/K_m)最低降到WT的0.1%以下。以NCD为辅酶的催化性能变化趋势相反。突变体比WT有更低的 K_m 值,表明其对NCD的亲合力增强;但突变体的催化速率与WT的相当,均在 $10^{-2} s^{-1}$ 量级。但由于 K_m 值降低较多,突变体9D1利用NCD的催化效率比WT提高仍然达10倍以上。突变体9D1对NAD的 K_m 值约1.0 mmol/L,对NCD的 K_m 值约为30 $\mu\text{mol/L}$;利用NCD的催化效率为858 L/(mol·s),是利用NAD的300倍。用 $(k_{cat}/K_m)_{\text{NCD}}/(k_{cat}/K_m)_{\text{NAD}}$ 来表示酶的NCD偏好性,WT与9D1的NCD偏好性分别为 3.2×10^{-2} 和 4.3×10^2 ,提高了13 000倍;而突变体3-1的NCD偏好性则相对提高了740倍。更重要的是,突变体9D1和3-1利用NCD的催化速率与WT利用NAD的催化速率均在 $10^{-2} s^{-1}$ 量级,表明它们不仅具有很好的NCD偏好性,还保留了较

高的催化活性。总体而言,成功获得了NCD偏好型MDH突变体9D1。

2.4.2 *Bs*MDH突变体的稳定性

初步比较了WT和突变体9D1在不同条件下的酶活性。结果表明,WT与9D1在25 °C环境下酶活性呈现相同的变化趋势,5 h后均能保持55%以上活性[图5(a)]。在37 °C, pH9.0的条件下孵育2 h后,WT和9D1均能保留酶活60%以上。此外,它们在37 °C下比30 °C或25 °C下具有更高活性[图5(b)];在pH9.0比pH5.0或7.0的缓冲体系中活性更高[图5(c)],即环境因素对酶活性的影响趋势相同。可见,突变体9D1除辅酶偏好性改变外,稳定性基本未受到影响。

2.5 辅酶结合空腔结构变化

对*Bs*MDH和突变体3-1、9D1进行分子对接,分别对接NAD和NCD,并分析辅酶结合空腔大小。从图6可以看出,*Bs*MDH中Y171、I196和N240形成的空腔远大于突变体3-1和9D1中相应残

表1 MDH及突变体催化甲醇氧化的动力学数据

Tab. 1 Kinetic data of methanol oxidation catalyzed by MDH variants

Enzyme	NAD			NCD			NCD preference [[$(k_{cat}/K_m)_{\text{NCD}}/$ $(k_{cat}/K_m)_{\text{NAD}}$]
	$K_m/(\mu\text{mol/L})$	k_{cat}/s^{-1}	k_{cat}/K_m /[L/(mol·s)]	$K_m/(\mu\text{mol/L})$	k_{cat}/s^{-1}	k_{cat}/K_m /[L/(mol·s)]	
WT	25.5±4.4	$6.1 \times 10^{-2} \pm 0.1 \times 10^{-2}$	2.4×10^3	328.6±35.8	$2.5 \times 10^{-2} \pm 0.1 \times 10^{-2}$	76.1	3.2×10^{-2}
3D2	6.6±0.5	$1.3 \times 10^{-2} \pm 0.0$	2.0×10^3	115.6±11.4	$2.0 \times 10^{-2} \pm 0.0$	173.0	8.7×10^{-2}
3F1	121.5±24.4	$1.0 \times 10^{-3} \pm 0.0$	8.2	77.2±11.3	$6.0 \times 10^{-3} \pm 0.0$	77.7	9.5
3-5	5.3±2.5	$1.0 \times 10^{-3} \pm 0.0$	188.7	47.1±7.7	$6.0 \times 10^{-3} \pm 0.0$	127.4	0.7
3-1	728.1±95.4	$9.0 \times 10^{-3} \pm 0.0$	12.4	44.3±6.6	$1.3 \times 10^{-2} \pm 0.0$	293.5	23.7
9D1	1 018.2±257.1	$2.0 \times 10^{-3} \pm 0.0$	2.0	33.8±10.2	$2.9 \times 10^{-2} \pm 0.0$	858.0	4.3×10^2

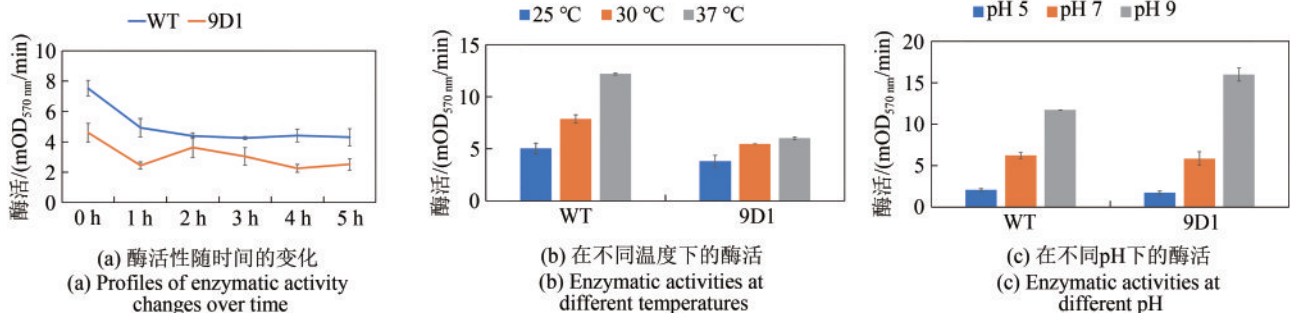


图5 不同条件下*Bs*MDH及突变体9D1的活性

Fig. 5 Enzymatic activity of *Bs*MDH (WT) and variant 9D1 under different conditions.

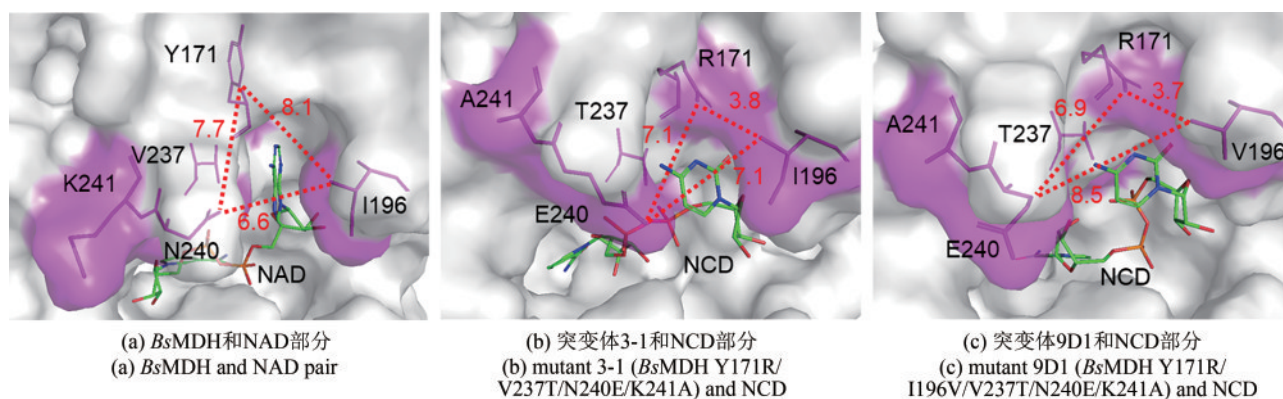


图6 不同酶-辅酶组合的分子对接结果

Fig. 6 Docking results of different enzyme-cofactor pairs binding pocket

基形成的空腔。*Bs*MDH中Y171和I196之间的距离为0.81 nm，而突变体3-1中R171和I196之间的距离缩短到0.38 nm，突变体9D1中R171和V196之间的距离为0.37 nm。此外，Y171R突变是辅酶结合空腔变小的主要原因。由于NAD的腺嘌呤结构在空间上大于NCD的胞嘧啶结构，突变体辅酶结合空腔变小导致难以结合NAD，而有利于结合NCD。初步说明辅酶结合空腔变小是MDH突变体偏好非天然辅酶NCD的主要原因。这较好地吻合了亚磷酸脱氢酶辅酶偏好性改造研究中通过突变体-NCD复合物晶体结构分析观察到的现象^[45]。

3 结论与展望

本文以NAD依赖型甲醇脱氢酶*Bs*MDH为模板，模拟并分析了MDH结构后，借助虚拟筛选参考了一部分会对其辅酶偏好性产生影响的位点，而后通过对腺嘌呤0.8 nm范围的位点进行了文库构建及筛选，确定了V237和N240位点对辅酶偏好性的影响，从而进一步分析MDH结构，对Y171、I196等位点进行了定点突变，最终成功得到偏好非天然辅酶NCD的突变体。通过分析实验数据，得到以下结论：

(1) 鉴于NCD的结构小于辅酶NAD，将改造MDH辅酶偏好性的重点放在缩小MDH辅酶结合空腔上。通过模拟*Bs*MDH的结构并确定NAD的结合模式，从而确定了与腺嘌呤相距0.8 nm范围内氨基酸位点；通过构建突变体文库、筛选和理性预测指导定点突变，最终得到偏好NCD的突变

体。通过对突变体9D1和3-1与NAD和NCD的分子对接，发现*Bs*MDH中Y171、I196和N240形成的空腔远大于突变体3-1和9D1中相应残基形成的空腔，进一步说明改造辅酶结合空腔对辅酶偏好性的重要性。

(2) 酶催化反应动力学数据表明，以NAD为辅酶时，突变体3F1、3-1和9D1比WT有更高的 K_m 值和更低的 k_{cat} 值，表明这3种突变体对NAD的亲和力降低和催化速率下降。WT与9D1对NCD的偏好性分别为 3.2×10^{-2} 和 4.3×10^2 ，酶的NCD偏好性提高达13000倍；同样，与WT比，突变体3-1的NCD偏好性提高了740倍。此外，突变体利用NCD的催化速率与WT利用NAD的催化速率均在 $10^{-2} s^{-1}$ 量级，表明它们保留了较高催化活性。

基于本文成果，未来可开展以下更深入的研究：

(1) 改造其他氧化还原酶的辅酶偏好性。本文改造MDH辅酶偏好性的经验和流程，可能应用于其他NAD依赖型氧化还原酶如甲醛脱氢酶等。事实上，本文及前期改造苹果酸酶^[27]、亚磷酸脱氢酶^[45]和甲酸脱氢酶^[46]的系列研究表明，在结构分析和半理性设计指导下，在辅酶结合空腔选择位点，构建突变体文库并筛选，并最终得到具有高NCD偏好性的突变体，通常均包含一些新引入的大侧链极性氨基酸突变。本研究的中后期，采用单位点突变方法构建13种突变体的实验，正是基于上述经验。因此，预计未来将其他NAD依赖型氧化还原酶改造为NCD偏好性的研究进程将变得更加有效和精准。

(2) 构建基于甲醇的新型氧化还原催化体系。

甲醇可分3步逐级生物氧化为CO₂，每步反应均有相应辅酶依赖型氧化还原酶从而产生计量的还原型辅酶。本研究得到NCD偏好型MDH将甲醇氧化为甲醛，而此前的研究已获得NCD偏好型甲酸脱氢酶^[29, 46]。未来如果将甲醛脱氢酶的辅酶偏好性也予以改造并获得NCD偏好型突变体，即可构建以甲醇为还原性底物的NCDH供给体系，用于选择性为特定代谢反应或途径提供还原力。本课题组认为，这种基于甲醇的NCDH供给体系，与此前构建的基于亚磷酸^[7]和甲酸^[8]的体系相比，更加绿色并具有更好的经济性。

总之，NCD偏好型MDH突变体将可作为独特的合成生物学功能元件，用于构建新型氧化还原催化体系和先进微生物细胞工厂。

参 考 文 献

- [1] WHITAKER W B, SANDOVAL N R, BENNETT R K, et al. Synthetic methylotrophy: engineering the production of biofuels and chemicals based on the biology of aerobic methanol utilization [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 33: 165-175.
- [2] CHANG K, WANG T F, CHEN J G. Hydrogenation of CO₂ to methanol over CuCeTiO_x catalysts [J]. *Applied Catalysis B-Environmental*, 2017, 206: 704-711.
- [3] DU X L, JIANG Z, SU D S, et al. Research progress on the indirect hydrogenation of carbon dioxide to methanol [J]. *ChemSusChem*, 2016, 9(4): 322-332.
- [4] COTTON C A R, CLAASSENS N J, BENITO-VAQUERIZO S, et al. Renewable methanol and formate as microbial feedstocks [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 62: 168-180.
- [5] ANTONIEWICZ M R. Synthetic methylotrophy: strategies to assimilate methanol for growth and chemicals production[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 59: 165-174.
- [6] ZHANG W M, ZHANG T, WU S H, et al. Guidance for engineering of synthetic methylotrophy based on methanol metabolism in methylotrophy[J]. *RSC Advances*, 2017, 7(7): 4083-4091.
- [7] SHEEHAN M C, BAILEY C J, DOWDS B C A, et al. A new alcohol dehydrogenase, reactive towards methanol, from *Bacillus stearothermophilus* [J]. *Biochemical Journal*, 1988, 252(3): 661-666.
- [8] WHITAKER W B, JONES J A, BENNETT R K, et al. Engineering the biological conversion of methanol to specialty chemicals in *Escherichia coli* [J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 39: 49-59.
- [9] WU T-Y, CHEN C-T, LIU J T-J, et al. Characterization and evolution of an activator-independent methanol dehydrogenase from *Cupriavidus necator* N-1[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(11): 4969-4983.
- [10] 凡立稳, 王钰, 郑平, 等. 一碳代谢关键酶——甲醇脱氢酶的研究进展与展望[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(2): 530-540.
FAN L W, WANG Y, ZHENG P, et al. Methanol dehydrogenase, a key enzyme of one-carbon metabolism: a review [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(2): 530-540.
- [11] TUYISHIME P, WANG Y, FAN L W, et al. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for methanol-dependent growth and glutamate production [J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 49: 220-231.
- [12] KIM S, LINDNER S N, ASLAN S, et al. Growth of *E. coli* on formate and methanol via the reductive glycine pathway [J]. *Nature Chemical Biology*, 2020, 16(5): 538-545.
- [13] KIM Y H, CAMPBELL E, YU J, et al. Complete oxidation of methanol in biobattery devices using a hydrogel created from three modified dehydrogenases[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(5): 1437-1440.
- [14] WANG Y P, SAN K Y, BENNETT G N. Cofactor engineering for advancing chemical biotechnology[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2013, 24(6): 994-999.
- [15] KARA S, SCHRITTWIESER J H, HOLLMANN F, et al. Recent trends and novel concepts in cofactor-dependent biotransformations[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(4): 1517-1529.
- [16] XIAO W S, WANG R-S, HANDY D E, et al. NAD(H) and NADP(H) redox couples and cellular energy metabolism [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2018, 28(3): 251-272.
- [17] GRAY K A, RICHARDSON T H, KRETZ K, et al. Rapid evolution of reversible denaturation and elevated melting temperature in a microbial haloalkane dehalogenase [J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2001, 343(6/7): 607-617.
- [18] MAMPEL J, BUESCHER J M, MEURER G, et al. Coping with complexity in metabolic engineering [J]. *Trends in Biotechnology*, 2013, 31(1): 52-60.
- [19] PAUL C E, ARENDS I W C E, HOLLMANN F. Is simpler better? synthetic nicotinamide cofactor analogues for redox chemistry [J]. *ACS Catalysis*, 2014, 4(3): 788-797.
- [20] KNAUS T, PAUL C E, LEVY C W, et al. Better than nature: nicotinamide biomimetics that outperform natural coenzymes [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(3): 1033-1039.
- [21] WEUSTHUIS R A, FOLCH P L, POZO-RODRÍGUEZ A, et al. Applying non-canonical redox cofactors in fermentation processes [J]. *iScience*, 2020, 23(9): 101471.
- [22] BLACK W B, ZHANG L Y, MAK W S, et al. Engineering a nicotinamide mononucleotide redox cofactor system for biocatalysis [J]. *Nature Chemical Biology*, 2020, 16(1): 87-94.
- [23] AGARWAL P K, WEBB S P, HAMMES-SCHIFFER S. Computational studies of the mechanism for proton and hydride transfer in liver alcohol dehydrogenase [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2000, 122(19): 4803-4812.
- [24] JI D B, WANG L, LIU W J, et al. Synthesis of NAD analogs to develop bioorthogonal redox system[J]. *Science China - Chem-*

- istry, 2013, 56(3): 296-300.
- [25] HOU S H, LIU W J, JI D B, et al. Synthesis of 1,2,3-triazole moiety-containing NAD analogs and their potential as redox cofactors [J]. *Tetrahedron Letters*, 2011, 52(44): 5855-5857.
- [26] HOU S H, LIU W J, ZHAO Z B. Synthesis of novel nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) analogs and their coenzyme activities [J]. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 2012, 32(2): 349-353.
- [27] JI D B, WANG L, HOU S H, et al. Creation of bioorthogonal redox systems depending on nicotinamide flucytosine dinucleotide [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(51): 20857-20862.
- [28] WANG L, JI D B, LIU Y X, et al. Synthetic cofactor-linked metabolic circuits for selective energy transfer [J]. *ACS Catalysis*, 2017, 7(3): 1977-1983.
- [29] GUO X J, LIU Y X, WANG Q, et al. Non-natural cofactor and formate-driven reductive carboxylation of pyruvate [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(8): 3143-3146.
- [30] LIAO Z P, YANG X T, FU H X, et al. The significance of aspartate on NAD(H) biosynthesis and ABE fermentation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 [J]. *AMB Express*, 2019, 9(1): 142.
- [31] 刘美霞, 李强子, 孟冬冬, 等. 烟酰胺类辅酶依赖型氧化还原酶的辅酶偏好性改造及其在合成生物学中的应用[J]. *合成生物学*, 2020, 1(5): 570-582.
- LIU M X, LI Q Z, MENG D D, et al. Protein engineering of nicotinamide coenzyme-dependent oxidoreductases for coenzyme preference and its application in synthetic biology [J]. *Synthetic Biology Journal*, 2020, 1(5): 570-582.
- [32] GUO X J, FENG Y B, WANG X Y, et al. Characterization of the substrate scope of an alcohol dehydrogenase commonly used as methanol dehydrogenase [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2019, 29(12): 1446-1449.
- [33] WATERHOUSE A, BERTONI M, BIENERT S, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes [J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W296-W303.
- [34] LILL M A, DANIELSON M L. Computer-aided drug design platform using PyMOL [J]. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 2011, 25(1): 13-19.
- [35] RUI L Y, CAO L, CHEN W, et al. Active site engineering of the epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 to enhance aerobic mineralization of *cis*-1,2-dichloroethylene in cells expressing an evolved toluene ortho-monooxygenase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(45): 46810-46817.
- [36] VAN DEN ENT F, LÖWE J. RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids [J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2006, 67(1): 67-74.
- [37] WU T K, LIU Y T, CHANG C H, et al. Site-saturated mutagenesis of histidine 234 of *Saccharomyces cerevisiae* oxidosqualene-lanosterol cyclase demonstrates dual functions in cyclization and rearrangement reactions [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(19): 6414-6419.
- [38] GRAGEROV A, HORIE K, PAVLOVA M, et al. Large-scale, saturating insertional mutagenesis of the mouse genome [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(36): 14406-14411.
- [39] ELHAWRANI A S, SESSIONS R B, MORETON K M, et al. Guided evolution of enzymes with new substrate specificities [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1996, 264(1): 97-110.
- [40] WANG L, ZHOU Y J, JI D B, et al. Identification of UshA as a major enzyme for NAD degradation in *Escherichia coli* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2014, 58/59: 75-79.
- [41] REETZ M T, CARBALLEIRA J D. Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes [J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(4): 891-903.
- [42] LAMZIN V S, DAUTER Z, POPOV V O, et al. High resolution structures of holo and apo formate dehydrogenase [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1994, 236(3): 759-785.
- [43] REETZ M T, WANG L W, BOCOLA M. Directed evolution of enantioselective enzymes: Iterative cycles of CASTing for probing protein-sequence space [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2006, 45(8): 1236-1241.
- [44] SUN Z T, LONSDALE R, ILIE A, et al. Catalytic asymmetric reduction of difficult-to-reduce ketones: triple-code saturation mutagenesis of an alcohol dehydrogenase [J]. *ACS Catalysis*, 2016, 6(3): 1598-1605.
- [45] LIU Y X, FENG Y B, WANG L, et al. Structural insights into phosphite dehydrogenase variants favoring a non-natural redox cofactor [J]. *ACS Catalysis*, 2019, 9(3): 1883-1887.
- [46] GUO X J, WANG X Y, LIU Y X, et al. Structure-guided design of formate dehydrogenase for regeneration of a non-natural redox cofactor [J]. *Chemistry a European Journal*, 2020, 26(70): 16611-16615.



通讯作者: 赵宗保(1968—),男,研究员,博士生导师,研究组组长。研究方向为能源生物技术、合成微生物学和化学生物学等。

E-mail: zhaozb@dicp.ac.cn



第一作者: 王俊婷(1993—),女,博士研究生。研究方向为非天然辅酶偏好的酶催化反应。

E-mail: wangjt@dicp.ac.cn