

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2021.06.008

甘薯膜结合态多酚氧化酶同源建模 及分子对接分析

李丰茂¹, 杨浩^{1,2}, 傅玉凡¹, 陈晓玲³, 唐云明¹

1. 西南大学 生命科学学院/重庆市甘薯工程研究中心, 重庆 400715;

2. 重庆市潼南中学校, 重庆 潼南 402660; 3. 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081

摘要: 通过生物信息学和同源建模分析发现甘薯 mPPO 含有 588 个氨基酸残基(aa), 其 N-端包含两段跨膜信号序列. 二级结构预测结果显示, mPPO 含有 18 个 α -螺旋、9 个 β -转角、18 个无规则卷曲, 同时二硫键稳定着酶分子结构, 活性中心被 6 个组氨酸包围. 分子对接结果揭示了 mPPO 与底物的结合位点以及相互作用方式.

关键词: 甘薯; 膜结合态多酚氧化酶; 褐变; 同源建模; 分子对接

中图分类号: Q946.5

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2021)06-0060-07

多酚氧化酶(Polyphenol oxidase, PPO, EC 1.10.3.1)是一类由核基因编码含铜质体能催化酚类物质氧化的金属酶. 最早由 Yoshida 在研究漆树液汁凝固现象时发现的一种活性物质, 随后 Keilin 和 Mann 报道了多酚氧化酶的分离纯化方法, 公布了多酚氧化酶的理化性质及酶学特征^[1], 开启了对多酚氧化酶的系统性研究. 国际生物化学和分子生物学联合命名委员会根据酶的催化特性将 PPO 分为两大类: 1) 单酚酶(EC 1.14.18.1); 2) 二酚酶(EC 1.10.3), 包括儿茶酚氧化酶(EC 1.10.3.1)和漆酶(EC 1.10.3.2)^[2]. 目前在植物体中多酚氧化酶主要以可溶性多酚氧化酶(soluble polyphenol oxidase, sPPO)和膜结合态多酚氧化酶(membrane-bound polyphenol oxidase, mPPO)两种形式存在, 其亚细胞定位在细胞质和叶绿体中^[3]. 多酚氧化酶参与植物光合作用^[4]、逆境胁迫^[5]、抗病虫害^[6]、花色形成^[7]、生物组织修复^[8], 对植物生长发育起到了积极的作用. 目前, 该酶在茶叶发酵^[9]、造纸工业^[10]、污水处理^[11]等领域得到了广泛应用.

甘薯(*Ipomoea batatas* (L.) Lam)又名红薯, 是我国主要粮食经济作物之一, 产量居全球之首, 而西南地区甘薯种植面积居全国第一. 据研究报道, 甘薯潜在的营养和药用价值非常高, 甘薯富含淀粉^[12]、蛋白质、膳食纤维^[13]、维生素^[14]、酚类^[15]、黄酮^[16]、胡萝卜素^[17], 具有增强免疫力、抗氧化、抗心血管疾病和抗肿瘤等药理作用^[18-20]; 而在工业能源方面, 甘薯淀粉作为原料发酵和生产燃料酒精和酒精汽油^[21], 以缓解目前的能源危机. 近年来, 鲜切甘薯因营养丰富、便捷以及高利用率等特点迅速得到广大消费者的青睐^[22]. 但是鲜切甘薯在生产过程中容易受到机械力的伤害, 多酚氧化酶与酚类化合物原本的细胞区域被破

收稿日期: 2020-05-10

基金项目: 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-10-C20-2020); 农业农村部农作物种质资源保护与利用专项(2018NWB036-09-01).

作者简介: 李丰茂, 硕士研究生, 主要从事蛋白质与酶工程的研究.

通信作者: 唐云明, 博士, 教授.

坏, 在氧气作用下甘薯表面生成棕色或黑色聚合物导致甘薯表面出现褐变, 褐变不仅会影响甘薯外观, 降低营养价值, 还能导致甘薯变质腐烂和浪费, 从而制约着甘薯产业的发展. 目前有研究显示 PPO 是导致果蔬褐变的主要物质^[22-23], 而 mPPO 是甘薯中主要的多酚氧化酶, 当甘薯组织受到损伤后, 其编码基因被诱导表达, mPPO 活性逐渐增加, 加速果蔬褐变腐烂, 然而有关 mPPO 导致褐变的分子机制尚不明确, 因此本研究主要利用同源建模和分子对接手段快速得到 mPPO 三维结构以及与底物结合的潜在位点, 为筛选和设计抑制剂以及深入理解褐变机理提供了新的理论基础.

1 材料与方法

1.1 材料

生物信息学数据库, 如 Uniprot (Universal Protein: <https://www.uniprot.org/>), PDB (Protein Data Bank: <https://www.rcsb.org/>); 在线软件, 如 SWISS-MODELL, PISPRED, PROCHECK, ERRAT, SYBYL-X 2.0; 本课题研究的甘薯膜结合态多酚氧化酶氨基酸序列来自 Uniprot 数据库 (登录号: Q9MB14).

1.2 方法

1.2.1 同源建模

先从 Uniprot 数据库中下载甘薯膜结合态多酚氧化酶氨基酸序列, 然后在蛋白质自动同源建模软件 SWISS-MODELL 中输入相应序列构建甘薯 mPPO 三维结构, 通过建模反馈信息, 获得了 4 个模板和 1 个目标模型 (即 mPPO 三维结构), 并将 mPPO 的三维结构保存为 PDB 格式以用于后续分子对接分析.

1.2.2 模型评估

利用在线蛋白质三维结构评估软件 PROCHECK 和 ERRAT 对所获得的甘薯 mPPO 模型进行评估以及对氨基酸残基(aa)整体性进行分析.

1.2.3 分子对接分析

从 TCMS (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform) 数据库中 (<https://tcmsp.com/molecule.php?qn=415>) 下载底物邻苯二酚、绿原酸、没食子酸、焦性没食子酸、表儿茶素等酚类化合物 3D 结构, 并保存为 mol2 格式, 然后利用分子对接软件 SYBYL-X 2.0 以铜质体区域为对接位点, 采用半柔性对接方式进行分子对接分析, 探究 mPPO 与酚类化合物的潜在结合位点以及相互作用方式^[24].

2 结果与分析

2.1 模型及其结构分析

同源建模是利用具有同源性的蛋白质三维结构作为模板, 对目标蛋白质进行三维结构预测. 由于蛋白质中的三维结构比蛋白质一级结构更加保守, 氨基酸的突变和替换通常发生在蛋白质表面回折区域, 蛋白质主链结构、疏水核心结构受序列变异影响很小, 因此用同源建模预测蛋白质三维结构是比较可靠、快速的方法. 任何一对蛋白质, 只要序列长度达到一定程度, 序列相似性超过 30%, 则具有相似的三维结构^[25]. 由于甘薯 mPPO 研究仍处于转录水平, 蛋白质结构数据库中也无相应的结构信息. 利用 SWISS-MODELL 对甘薯 mPPO 同源建模, 一共获得了 4 个多酚氧化酶三维结构模板, 其在 PDB 数据库中的登录号分别为 6ELS (Latent apple tyrosinase), 4Z11 (Latent aurone polyphenol oxidase), 6R83 (squid hemocyanin), 4D87 (Bacillus megaterium tyrosinase), 氨基酸序列相似性分别为 54.49%, 44.02%, 21.23%, 23.57%. 由于序列相似性越高, 获得的三维结构越可靠, 因此选取了序列相似性最高的 6ELS 作为模板建模 (图 1), 使获得的模型最佳, 其甘薯 mPPO 模型如图 2.

MODEL	191
6els.1.A	KIIDFKLP-AP-AKLP-IRPERAHAVDQAYRQKYSKAMELMKALPDDDPREFYQQAAVHCAYCDGAYDQVGF	101
MODEL	261
6els.1.A	PELELQIHNSWLFPPFHRVYLYFFPEKILGKLINDPTFALPFWNWDSPAGMFLPALYADPKSPLYDKERSA	171
MODEL	330
6els.1.A	NHQEPTLDVLDLYNGTEEDVSKETTINANLKIIMYRIMVSNKNAKLFEGNPFYFAGDEPDF-GGGSIESTPH	240
MODEL	400
6els.1.A	APVHLWIGD--NDEENFEDMGNFYSAGRDEEFSAHHSNVDRMWSIWKTLGGK--RDLTDSDWLDSGFLF	306
MODEL	457
6els.1.A	YNENAEELVRVQVSDOLETKNLGYVYQDVDPWLSKPTPRRAKVALSKYAKKLGVAHAAVASSSKVYVAST	376
MODEL	526
6els.1.A	EFPLSLGSKISDQVHRPKPKKRSKKAKEDEEEILVIEGIEFDRDVAWKFDVYVNDVDLPSGPKTEFAG	446
MODEL	588
6els.1.A	SAFLPHHNTS.....	506

图 1 甘薯 mPPO 与模板 6ELS 序列比对

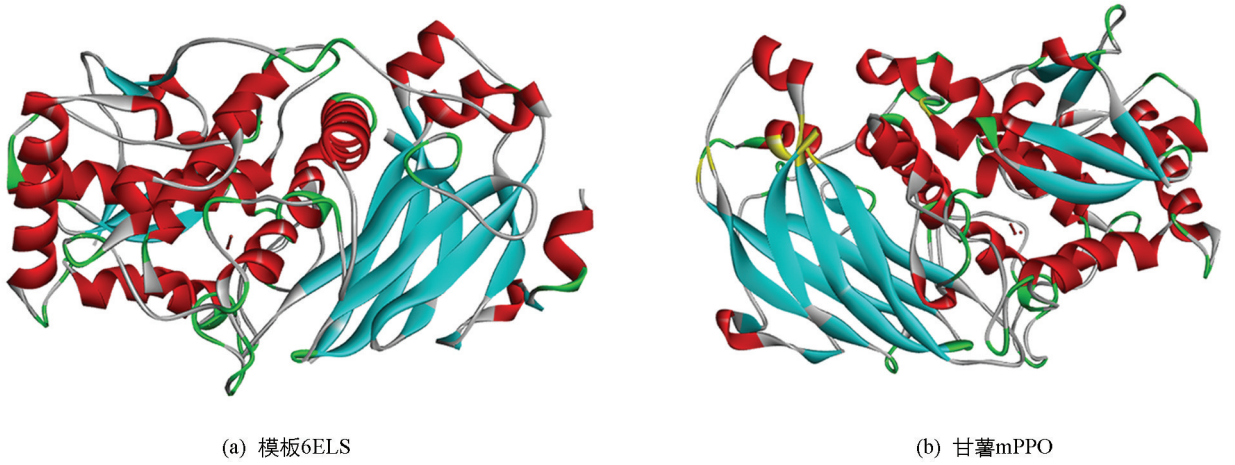


图 2 模板 6ELS 和甘薯 mPPO 三维结构

通过甘薯 mPPO 与模板 6ELS 序列比对以及利用 PISPRED 对 mPPO 二级结构预测发现, mPPO 二级结构含有 18 个 α -螺旋、9 个 β -转角、18 个无规则卷曲(图 3), 其 1~50 aa 和 51~88 aa 为 2 段跨膜信号序列, 说明叶绿体内的 mPPO 会通过转移肽转移至细胞质内发挥作用. 结合图 2 可以看出甘薯 mPPO 活性区域含有 3 个 CuA 和 3 个 CuB, 并被 His178, His199, His208, His330, His334, His366 包围. Cys99→Cys116, Cys115→Cys179, Cys182→Cys199 组成了 mPPO 链间二硫键稳定着酶的结构.

2.2 模型评估

将 SWISS-MODEL 建模后序列相似性最高的 mPPO 模型通过 PROCHECK 和 ERRAT 进行评估, 图 4(a)显示了 mPPO 拉式构象图中有 92%残基位于允许区[A, B, L], 7.2%残基位于最大允许区域[a, b, l, p], 0.5%残基位于扭转角禁止区域[~a, ~b, ~l, ~p], 一般认为允许区域超过 90%, 模型中蛋白质残基的二面角都在合理的区间, 则符合立体化学能量规则, 表明其模型的可靠性较高^[26]. 图 4(b), 图 4(c)显示 mPPO 的 QMEAN 为 0.67(QMEAN 值在 0~1 之间, 数值越大, 获得理想模型的可能性越大^[27]), 且 Z 值均大于 2, 反映出模型质量可靠. ERRAT 对 mPPO 整体三维结构进行评估, 有 95.15%的残基在 95%误差值以外, 综上所述甘薯 mPPO 模型合格(图 4d), 可以用于后续分析计算.

2.3 催化位点分析

分子对接是在分子水平上通过化学计算研究分子的几何结构、分子间相互作用的方法, 其理论基础来源于 E. Fisher 提出的“锁钥模型”, 该模型描述了酶与底物专一性的结合, 但存在一定局限性. Koshland 提出了“诱导契合原理”, 该理论认为受体和配体在相互结合时会发生结构变化^[28]. 利用分子模拟软件

SYBYLX-2.0 分别将邻苯二酚、绿原酸、没食子酸、焦性没食子酸、表儿茶素与 mPPO 进行分子对接, 在对接过程中蛋白受体和小分子配体的构象是可柔性可变化的, 以满足空间形状和能量匹配. 结果发现在活性位点附近, Gln197, Leu212, Phe204, His365, Phe362, Phe205, Arg209, Thr331 以氢键的方式与 5 种酚类化合物结合(表 1), 说明这几个残基都是潜在结合位点(图 5).

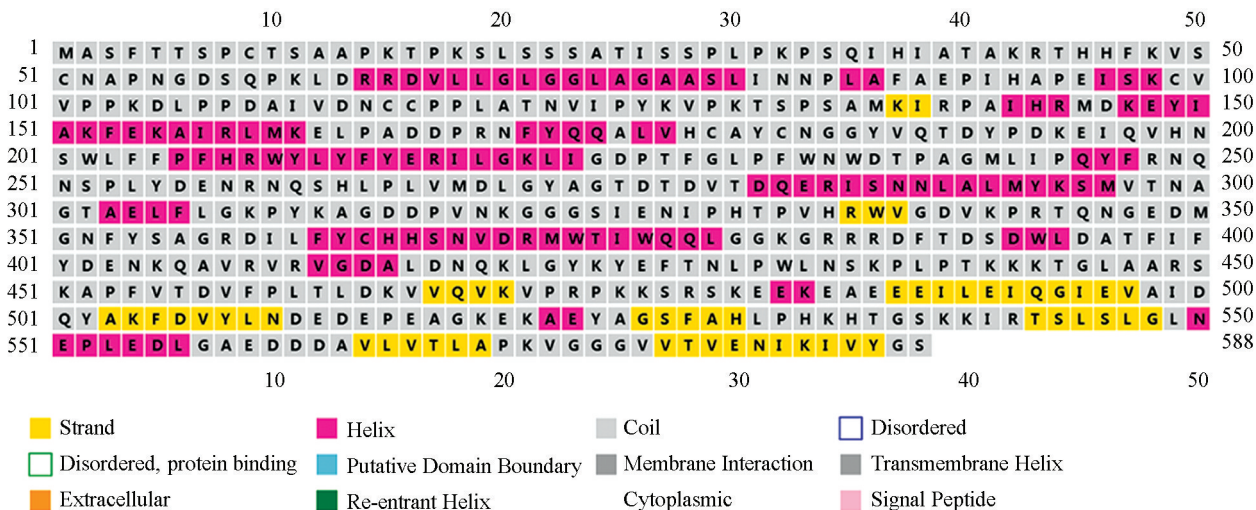
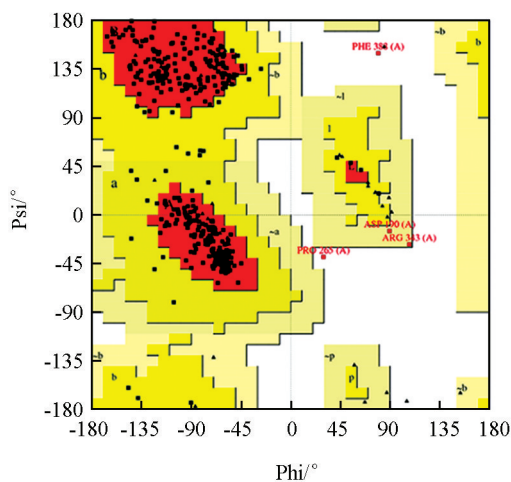
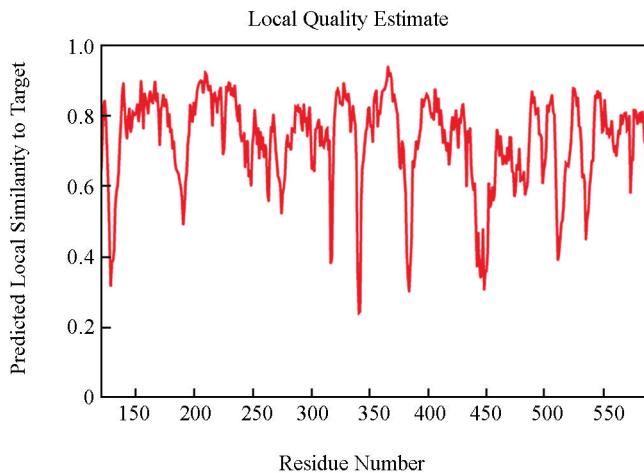


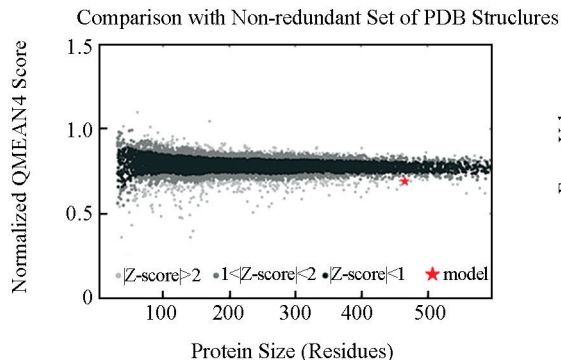
图 3 甘薯 mPPO 二级结构



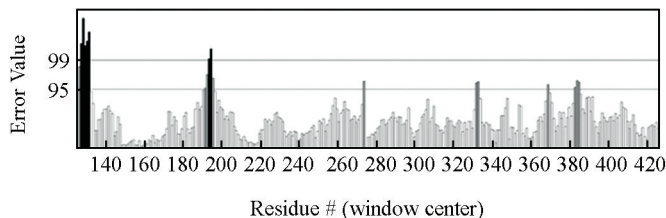
(a) mPPO 拉式构象图



(b) 同源建模质量评估



(c) 同源建模获得的 mPPO 蛋白模型 QMEAN 的 Z 值在标准分布中的位置



(d) ERRAT 软件评估 mPPO 模型结构

图 4 mPPO 模型评估

表 1 甘薯 mPPO 与不同底物结合位点

底物	结合位点	底物	结合位点
邻苯二酚	Gln197	焦性没食子酸	Phe362
绿原酸	Gln197, Leu212, Phe204	表儿茶素	Phe205, Arg209, Thr331
没食子酸	Phe362, His365		

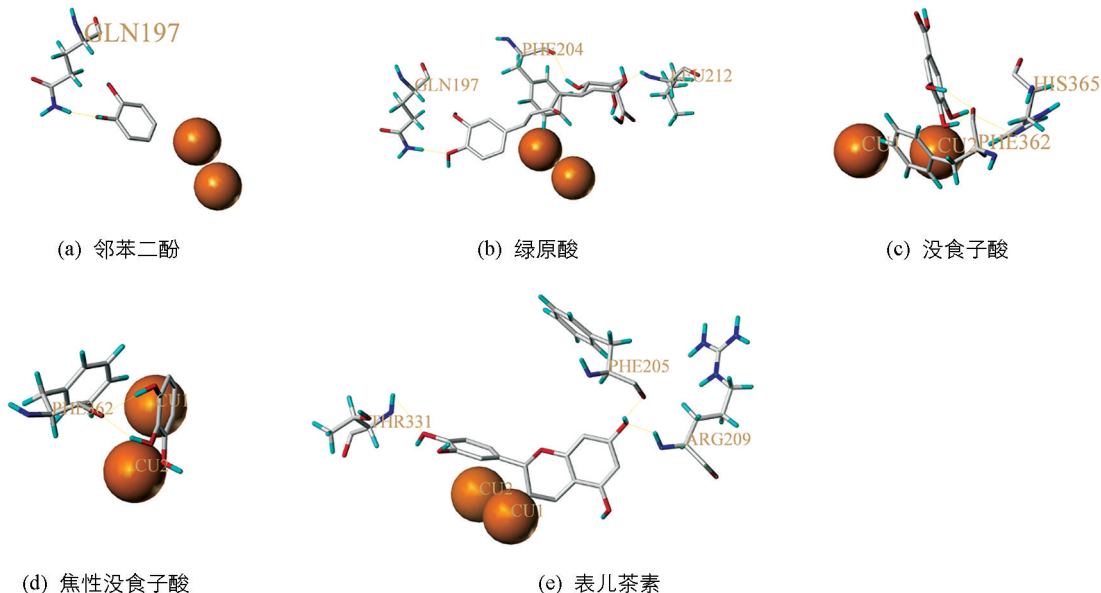


图 5 甘薯 mPPO 与酚类化合物分子对接结果

3 讨论与结论

蛋白质作为生命活动承担者,其具有的功能很大程度上与自身的空间结构有关,因此,对蛋白质空间结构的研究有助于了解其工作机理。目前蛋白质数据库收集的蛋白质结构数量不断增加,但是蛋白质结构的测定仍然落后于基因测序^[29]。X-射线晶体衍射和核磁共振技术是获取蛋白质结构信息的重要手段,但蛋白质晶体表达、提纯与结晶增加了测定的难度。为了加快蛋白质结构测定速度,发展理论蛋白质结构测定方法显得尤为重要。因此,利用蛋白质相关的数据库信息进行生物信息学分析不仅可以快速了解、认识目标蛋白质,还可以快速、高效地解析蛋白质的结构和功能,以研究蛋白质与配体的相互作用及其分子机制。

通过分析氨基酸序列发现, mPPO 二级结构含有 18 个 α -螺旋、9 个 β -转角、18 个无规则卷曲,其中 1~50 aa, 51~88 aa 为 2 段跨膜信号序列,这与茄子(81 aa), 苹果(89 aa), 土豆(86 aa), 番茄(99 aa) mPPO 跨膜转移肽不同^[30], 植物 mPPO N-端转移肽差异可能与不同物种 mPPO 转运方式有关。铜质体区域是甘薯 mPPO 活性部位, 受 His178, His199, His208, His330, His334, His366 包围, 而在单亚基甘薯多酚氧化酶中, 只存在单个铜质体, 并被 His240, His244, His274 包围, 葡萄 PPO 中活性区域受 His211, His220, His342, His346, His375 包围^[31], 这表明 PPO 活性区域差异与所编码的基因以及所在区域的执行功能有关。

分子对接结果显示, 甘薯 mPPO 中 Gln197, Leu212, Phe204, His365, Phe362, Phe205, Arg209, Thr331 等残基与邻苯二酚、绿原酸、没食子酸、焦性没食子酸、表儿茶素相互作用, 表明甘薯 mPPO 不仅催化区域广, 而且催化底物种类多, 而甘薯组织受到机械伤害时, 能与各种酚类物质反应, 验证了多酚氧化酶是导致果蔬褐变的主要氧化酶。氢键驱动 mPPO 和底物结合, 正是由于他们之间的这种分子相互作用

用,使得甘薯 mPPO 与底物结合的亲和力高,促进了甘薯 mPPO 催化效率.因此,可以通过结合位点设计抑制剂屏蔽掉相关氨基酸残基上的官能团,削弱与酶的结合能力,该实验结果还可以通过基因敲除或者 RNA 干扰技术培育无褐变甘薯品种,扩大甘薯物种丰富度,降低因褐变造成的经济损失.

综上所述,本实验挖掘甘薯 mPPO 相关数据掌握了其结构特征以及潜在催化靶点,为进一步揭示甘薯褐变分子机制和筛选高效无毒害抑制剂提供了新的思路.

参考文献:

- [1] KEILIN D, MANN T. Laccase, A Blue Copper-Protein Oxidase from the Latex of *Rhus Succedanea* [J]. *Nature*, 1938, 143(3610): 23-24.
- [2] TARANTO F, PASQUALONE A, MANGINI G, et al. Polyphenol Oxidases in Crops: Biochemical, Physiological and Genetic Aspects [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(2): 377.
- [3] CHAZARRA S, CABANES J, ESCRIBANO J, et al. Partial Purification and Characterization of Latent Polyphenol Oxidase in Iceberg Lettuce (*Lactuca sativa* L.) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996, 44(4): 984-988.
- [4] BOECKX T, WINTERS A L, WEBB K J, et al. Polyphenol Oxidase in Leaves: Is There any Significance to the Chloroplastic Localization [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(12): 3571-3579.
- [5] 高文,谢从华.马铃薯 StRab 互作蛋白的筛选与分析 [J]. *河南农业科学*, 2015, 44(12): 6-10.
- [6] 金晓磊,沈元月,刘敏,等.草莓果实多酚氧化酶基因的克隆及序列分析 [J]. *分子植物育种*, 2008, 6(5): 987-994.
- [7] 赵昶灵,李云,陈中坚,等.花色苷的酶降解 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2011, 19(6): 576-584.
- [8] 王曼玲,胡中立,周明全,等.植物多酚氧化酶的研究进展 [J]. *植物学通报*, 2005, 22(2): 215-222.
- [9] 付赢莹,刘通讯.多酚氧化酶对普洱茶渥堆发酵过程中品质变化的影响 [J]. *现代食品科技*, 2015, 31(3): 197-201.
- [10] 王燕蓬,秦梦华,徐清华.浅谈漆酶在制浆造纸中的应用研究 [J]. *造纸化学品*, 2008, 20(4): 20-23.
- [11] 王松,谢益民,王鹏,等.漆酶去除造纸废水中木素及多酚类化合物应用 [J]. *环境科学与技术*, 2008, 31(7): 53-57.
- [12] 王佳佳,杨春贤,曾令江,等.高淀粉甘薯新品种“渝薯1号”的选育研究 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2019, 41(7): 30-35.
- [13] 高美玲,余诚玮,范亚苇,等.甘薯渣中可溶性膳食纤维对肠道菌群代谢产物的影响 [J]. *中国食品学报*, 2020, 20(12): 56-61.
- [14] 黄婷,梁清干,陈艳丽,等.海南夏秋季10个菜用甘薯品种比较试验 [J]. *广东农业科学*, 2020, 47(1): 9-15.
- [15] 师超,卞科.黄心甘薯多酚类物质的提取工艺研究 [J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2011, 32(2): 19-22.
- [16] 罗建光,孔令义.巴西甘薯叶黄酮类成分的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(7): 516-518.
- [17] 谢逸萍,马飞,李洪民,等.甘薯 F₁ 胡萝卜素含量测定及遗传趋势探讨 [J]. *江苏农业科学*, 2006, 34(3): 54-56.
- [18] CHEN H, SUN J, LIU J, et al. Structural Characterization and Anti-Inflammatory Activity of Alkali-Soluble Polysaccharides from Purple Sweet Potato [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 131: 484-494.
- [19] KUMAR S, CRUZ A M, GUPTA L, et al. A Peroxidase/Dual Oxidase System Modulates Midgut Epithelial Immunity in *Anopheles Gambiae* [J]. *Science*, 2010, 327(5973): 1644-1648.
- [20] PARK K H, KIM J R, LEE J S, et al. Ethanol and Water Extract of Purple Sweet Potato Exhibits Anti-Atherosclerotic Activity and Inhibits Protein Glycation [J]. *Journal of medicinal food*, 2010, 13(1): 91-98.
- [21] 张彩霞,谢高地,李士美,等.中国甘薯乙醇的资源潜力及空间分布 [J]. *资源科学*, 2010, 32(3): 505-511.
- [22] 王礼群,刘硕,杨春贤,等.鲜切甘薯不同部位褐变机理差异 [J]. *食品科学*, 2018, 39(1): 285-290.
- [23] MURATA M, TSURUTANI M, TOMITA M, et al. Relationship Between Apple Ripening and Browning: Changes in Polyphenol Content and Polyphenol Oxidase [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, 43(5): 1115-1121.
- [24] 周游,王远强,何清秀.人酪氨酸酶的同源建模研究 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2020, 42(8): 42-48.
- [25] 王晓春.螺旋桨家族蛋白质序列和结构关系研究 [D]. 武汉;华中科技大学, 2007.

- [26] 张燎原, 曹 阳, 夏启容, 等. 来源于克雷伯氏菌的 1, 3-丙二醇氧化还原酶的同源建模 [J]. 生物信息学, 2006, 4(3): 102-104, 127.
- [27] 郑敏婧, 李晓云, 李 玲. 野葛葡糖基转移酶 PIUGTs 的同源建模及其活性位点分析 [J]. 生物信息学, 2013, 11(4): 287-292.
- [28] KOSHLAND D E. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis [J]. PNAS, 1958, 44(2): 98-104.
- [29] 曾炳佳, 曹以诚, 杜正平, 等. 同源建模关键步骤的研究动态 [J]. 生物学杂志, 2008, 25(2): 7-10.
- [30] MISHRA B B, GAUTAM S, SHARMA A. Free Phenolics and Polyphenol Oxidase (PPO): The Factors Affecting Post-Cut Browning in Eggplant (*Solanum Melongena*) [J]. Food Chemistry, 2013, 139(1-4): 105-114.
- [31] VIRADOR V M, REYES GRAJEDA J P, BLANCO-LABRA A, et al. Cloning, Sequencing, Purification, and Crystal Structure of Grenache (*Vitis Vinifera*) Polyphenol Oxidase [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(2): 1189-1201.

Homology Modeling and Molecular Docking Analysis of Sweet Potato Membrane-Bound Polyphenol Oxidase

LI Feng-mao¹, YANG Hao^{1,2}, FU Yu-fan¹,
CHEN Xiao-ling³, TANG Yun-ming¹

1. School of Life Science, Southwest University/Engineering & Technology Center for Sweet Potato, Chongqing 400715, China;

2. Tongnan High School, Tongnan Chongqing 402660, China;

3. Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: In a present study, bioinformatics and homology modeling analysis showed that mPPO of sweet potato contained 588 amino acid residues, and its N-terminal contained two transmembrane signal sequences; secondary structure prediction results indicated that mPPO were composed of 18 α -helices, 9 β -turns and 18 random coils, disulfide bonds stabilized the molecular structure of the enzyme, and the active center was surrounded by 6 molecules; and molecular docking results revealed the binding sites and the interaction modes between mPPO and its substrates.

Key words: sweet potato; membrane-bound polyphenol oxidase; browning; homology modeling; molecular docking

责任编辑 周仁惠