

## • 药材与资源 •

川芎咖啡酸-3-*O*-甲基转移酶的同源建模和定点突变

俞继华, 李洋洋, 宋 婧, 李娟娟, 张 赶, 朱建全, 向 缅, 王万军, 廖 海\*, 周嘉裕\*  
西南交通大学生命科学与工程学院, 四川 成都 610031

**摘要:** 目的 构建川芎咖啡酸-3-*O*-甲基转移酶 (*Ligusticum chuanxiong* caffeic acid-3-*O*-methyltransferase, LCCOMT) 的三维模型, 并利用定点突变对模型进行验证。方法 利用同源建模构建 LCCOMT 的初始三维模型; 对初始三维模型进行动力学优化; 将优化后的模型对接咖啡酸, 预测 LCCOMT 的活性位点; 对预测的活性位点展开定点突变, 检测突变型蛋白的生物活性。结果 LCCOMT 的三维模型能够与咖啡酸成功对接, His268 残基可能是 LCCOMT 的活性位点, 推测其能够与咖啡酸 3-OH 形成氢键。H268N 与 H268Q 2 种突变酶分别丧失 94.85% 和 95.28% 的催化活性。结论 同源建模能够准确预测 LCCOMT 的三维模型。His268 为 LCCOMT 的关键氨基酸残基, 其作用可能是作为共轭碱, 参与咖啡酸 3-OH 的去质子化反应。

**关键词:** 川芎; 阿魏酸; 咖啡酸-3-*O*-甲基转移酶; 同源建模; 定点突变

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)20-3677-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.20.020

## Homology modeling and site-directed mutagenesis of caffeic acid-3-*O*-methyltransferase from *Ligusticum chuanxiong*

YU Ji-hua, LI Yang-yang, SONG Jing, LI Juan-juan, ZHANG Gan, ZHU Jian-quan, XIANG Mian,  
WANG Wan-jun, LIAO Hai, ZHOU Jia-yu

School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China

**Abstract: Objective** To construct the three dimensional models of *L. chuanxiong* caffeic acid-3-*O*-methyltransferase (LCCOMT) and verify the model using site-directed mutagenesis technology. **Methods** The three-dimensional model was constructed by homology modeling using the crystal structure of COMT from *Medicago sativa* as a temple. Caffeic acid was docked into the optimized model of LCCOMT to predict the active site. The predicted site was mutated using site-directed mutagenesis technology. Then, the activity of mutant enzyme was detected. **Results** The molecular docking, which showed there were hydrogen bonds between His268 and 3-OH of caffeic acid, was successful. Two mutant enzymes, H268N and H268Q, lost 94.85% and 95.28% of their activity respectively. **Conclusion** The His268 is confirmed as one of the key residues of LCCOMT. It may play a role as a base in the deprotonation reaction of the 3-OH of caffeic acid.

**Key words:** *Ligusticum chuanxiong* Hort.; ferulic acid; caffeic acid-3-*O*-methyltransferase; homology modeling; site-directed mutagenesis

川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 为四川省著名的道地药材, 其主要活性成分为阿魏酸<sup>[1]</sup>。目前已知阿魏酸的生源途径起源于苯丙氨酸, 经肉桂酸、对香豆酸、咖啡酸, 最后由咖啡酸-3-*O*-甲基转移酶 (caffeic acid-3-*O*-methyltransferase, COMT) 以咖啡酸和以 *S*-腺苷甲硫氨酸为底物催化合成阿魏酸。

COMT 可能是阿魏酸生物合成途径中的一个关键酶<sup>[2-4]</sup>。本实验室在前期研究中已获得川芎根茎与叶的转录组数据, 从中发现并克隆了川芎 COMT (LCCOMT) 基因 (GenBank 登录号 AKZ17612.1)<sup>[5]</sup>。进一步将 LCCOMT 基因转化大肠杆菌, 并获得有生物活性的重组蛋白<sup>[6]</sup>。本实验利用同源建模

收稿日期: 2016-03-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31371232, 31500276); 成都市科技技术研发项目 (2015-HM01-00051-SF); 国家级大学生创新创业训练计划资助项目 (201510613063)

作者简介: 俞继华 (1991—), 男, 在读硕士, 研究方向为植物抗逆与次生代谢。Tel: (028)87600965 E-mail: yujihua@my.swjtu.edu.cn

\*通信作者 廖 海 Tel: (028)87600965 E-mail: ddliahai@home.swjtu.edu.cn

周嘉裕 Tel: (028)87600965 E-mail: spinezhou@home.swjtu.edu.cn

方法构建 LCCOMT 的三维模型,并结合定点突变技术鉴定其可能的关键氨基酸残基,这为 LCCOMT 的结构功能研究及应用奠定了理论基础。

## 1 材料

LCCOMT-pET28 重组大肠杆菌表达载体由本实验室构建并保存。大肠杆菌 BL21 由本实验室保存。限制性内切酶、Prime star DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、均购自 TaKaRa 公司。RNA 提取试剂盒 *Omega Plant RNA Kit*、质粒小提试剂盒 *Omega Plasmid Mini Kit I*、胶回收试剂盒 *Gel Extraction Kit* 为 OMEGA 公司产品。异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自 MEKER 公司,卡那霉素、S-腺苷甲硫氨酸 (SAM)、咖啡酸对照品(批号 201317)均购自生工生物工程有限公司,二硫苏糖醇 (DTT) 购自 BIOSHARP 公司,阿魏酸对照品(批号 110773-201313)购自成都市药品检验所,质量分数均大于 98%。

## 2 方法

### 2.1 序列比对和同源建模

使用 NCBI 的 Protein Blast 工具,搜寻 Protein Database Bank (PDB) 数据库与 LCCOMT 同源性和一致性较高的蛋白质为模板。利用 Discovery Studio (DS) 2.5 软件平台完成二级结构预测和模板序列的序列比对。通过 DS 的 MODELER 模块进行同源建模,获得 LCCOMT 的初始模型。利用 DS 的 Proteins Superimposing 模块将 LCCOMT 的始模型和模板的三维结构进行叠合比较,根据均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD) 分析建模与模板的相似度。

### 2.2 初始模型的结构优化

利用 DS 2.5 软件的能量最小化和分子动力学模拟模块对初始模型进行结构优化。步骤:(1) Minimization: 将模型溶解于生理盐水环境,首先采用 1 000 步最陡下降法对体系进行优化;随后,采用 5 000 步共轭梯度法对体系进行再次优化;(2) Heating: 设置温度梯度为 50 K 到 300 K,进行 200 ps 的动态模拟;(3) Equilibration: 在  $T=300$  K 条件下进行 200 ps 的分子动力学模拟;(4) Production: 同样在热力学温度条件下进行 200 ps 的分子动力学计算,每隔 500 fs 收集 1 个分子构象保存,选取能量最低的构象为最终的模型结构。COMT 的立体化学可靠性通过 PROCHECK 计算的 Psi/Phi Ramachandran 图进行评估<sup>[7-8]</sup>;蛋白质侧链氨基酸残基的兼容性通过 Verify-3D 进行检测<sup>[9]</sup>。

### 2.3 分子对接

咖啡酸 (Compound ID: 689043; MF:  $C_9H_8O_4$ ) 的三维结构来源于 NCBI 的 Pubchem 数据库。利用 DS 软件的 CDOKER 模块对接 LCCOMT 与咖啡酸分子,最后对咖啡酸-LCCOMT 复合物进行动力学优化。

### 2.4 LCCOMT 基因的定点突变

LCCOMT 基因的定点突变采用一步法<sup>[7]</sup>,以 pET28/LCCOMT 野生型重组载体为模板,根据 His268 所对应的核苷酸设计突变引物(表 1)。

表 1 突变引物及其序列  
Table 1 Mutation primers and their sequences

引物	序列 (5'-3')
Asn1	AAGTGGATATGTAACGATTGGAGCGAT
Asn2	ATCGCTCCAATCGTTACATATCCACTT
Gln1	AAGTGGATATGTCAGGATTGGAGCGAT
Gln2	ATCGCTCCAATCCTGACATATCCACTT

以含有 LCCOMT 基因的重组质粒 DNA 为模板,用引物 1 和引物 2 进行 PCR 扩增,获得含有突变碱基的 LCCOMT 基因。PCR 反应体系总量为 50  $\mu$ L,在美国 Applied Biosystems 公司 Veriti<sup>®</sup> 96 孔快速 PCR 仪上进行。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C, 4 min; 95  $^{\circ}$ C, 1 min;  $T_m$ , 1 min; 68  $^{\circ}$ C, 6 min; 18 个循环; 72  $^{\circ}$ C, 10 min; 4  $^{\circ}$ C 保存。其中 Asn 突变的  $T_m$  为 59  $^{\circ}$ C, Gln 突变的  $T_m$  为 61  $^{\circ}$ C。

DNA 片段的回收、酶切、克隆、转化方法参见文献报道<sup>[6]</sup>及试剂盒说明;扩增获得 H268N 与 H268Q 2 种突变型基因,构建突变型原核表达载体,导入 BL21 菌株中,转化完成后取 100  $\mu$ L 菌液涂布于含有卡那霉素 (Kan) 的 LB 平板上进行筛选,分别获得突变型菌株。每个突变型菌株挑取 3 个菌落提取质粒,分别进行酶切和 PCR 鉴定,由成都擎科梓熙生物技术有限公司测序,验证突变的正确性。

### 2.5 突变酶的表达、纯化及活性检测

突变酶的诱导表达、纯化参见文献方法<sup>[6]</sup>。重组大肠杆菌 BL21 在含 Kan 的 LB 培养基培养至  $A_{600}$  值大于 0.6 时,加入 IPTG 使终浓度为 1 mmol/L,过夜诱导表达 (37  $^{\circ}$ C, 200 r/min)。菌液在超声破碎和冻融后经过  $NI^{2+}$  亲和柱后得到纯化蛋白质。

突变酶的活性检测方法参见文献方法<sup>[6]</sup>。检测反应体系包括 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0), 500

μmol/L 咖啡酸, 1 mmol/L SAM, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L DTT 与 1 000 μg 纯化蛋白, 总体积为 10 mL, 37 °C 下反应 2 h 后加 1 mL 浓盐酸终止反应。用 5 mL 醋酸乙酯萃取 3 次得到反应萃取液并浓缩至 1 mL 左右。浓缩萃取液经过滤后 HPLC 检测, 根据咖啡酸和阿魏酸积分后的峰面积来计算酶活性。

### 3 结果和分析

#### 3.1 序列比对和同源建模

BLAST 的结果显示, LCCOMT 的氨基酸序列

与来源于紫花苜蓿的 COMT (PDB ID: 1KYZ\_E) 具有最高的同源性, 其序列一致性 (identity) 为 72.7%, 相似度 (similarity) 为 85.9%。因此, 本实验选择 1KYZ 作为 LCCOMT 同源建模的模板。二级结构预测结果表明, LCCOMT 含有 17 个 α 螺旋 (48.9%), 9 个 β 折叠 (11.3%) 及 27 个无规卷曲 (39.8%) (图 1)。Proteins Superimposing 显示 LCCOMT 初始模型与 1KYZ 的 RMSD 值为 0.042 5 nm, 表明两者具有十分相似的三维框架 (图 2)。

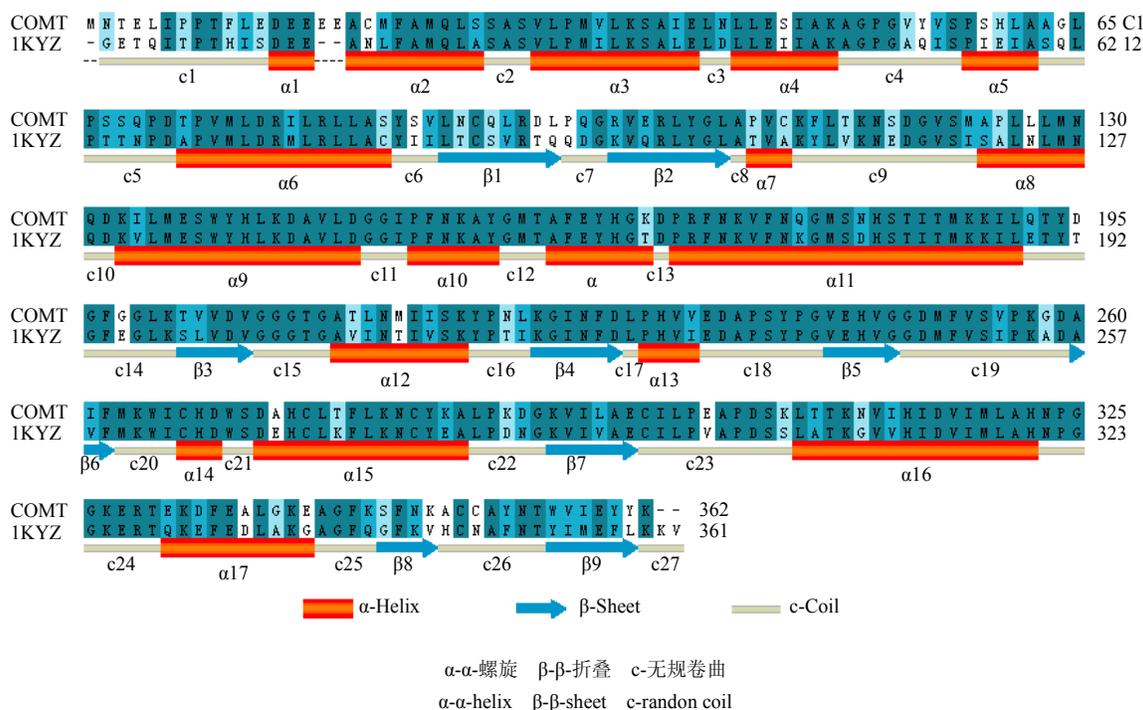


图 1 LCCOMT 与 1KYZ 的序列比对

Fig. 1 Sequence alignment of LCCOMT and 1KYZ

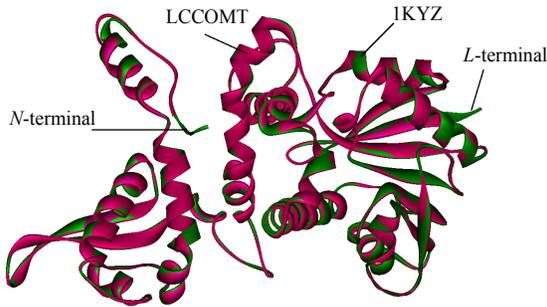
#### 3.2 同源模型的验证

LCCOMT 的初始模型经过动力学优化后使用 Psi/Phi Ramachandran 图分析模型主链和侧链的立体化学构型的合理性 (图 3)。结果表明 LCCOMT 优化模型的绝大多数 φ、ψ 二面角均在合理范围内, 其中核心区域占 89.5%, 允许区域占 8.6%, 仅有 0.6% 在不允许区域内。Verify-3D 分析结果显示 LCCOMT 优化模型中有 98.2% 的侧链氨基酸残基得分在 0.2 以上 (图 4), 表明模型的侧链环境是合理的。以上结果均表明 LCCOMT 优化模型能够用于后续的对接研究。

#### 3.3 对接研究与活性位点分析及催化机制推测

LCCOMT 主要含有 2 个结构域, 即蛋白二聚化结构域与依赖 SAM 的催化活性结构域<sup>[10-11]</sup>。蛋白

二聚化结构域位于 LCCOMT 的 N 末端, 包括了 33~84 位等多个氨基酸残基, 该结构域在多个植物的甲基转移酶中均有出现, 其主要功能是促进 COMT 单体二聚化<sup>[12]</sup>。SAM 依赖的催化活性结构域主要由 Leu126、Met129、Asn130、Lue135、Phe175、Met179、His182、Trp265、His268、Asp269、Glu296、Ile318、Met319、His322 与 Asn323 等氨基酸残基组成, 其主要功能是将 SAM 上的甲基转移到底物分子中。其中的部分氨基酸残基能够通过疏水作用与氢键来稳定咖啡酸分子在催化中心的立体位置, 比如 His182 与咖啡酸的-OH 之间的氢键。序列比对发现, LCCOMT 含有氧甲基转移酶家族中高度保守的 His268 残基, 该残基作为质子受体, 在底物甲基化的过程中可能发挥了关



绿色为模板 1KYZ，红色为 LCCOMT 的三维模型  
Green part is the structure of 1KYZ, red part is the structure of LCCOMT

图 2 LCCOMT 初始模型与 1KYZ 的三维结构叠合  
Fig. 2 3D superimposition structure of LCCOMT initial model and 1KYZ

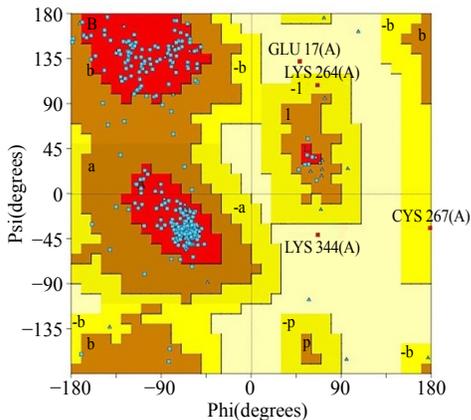


图 3 LCCOMT 优化模型的 Psi/Phi Ramachandran 图  
Fig. 3 Psi/Phi Ramachandran plot of LCCOMT optimized model

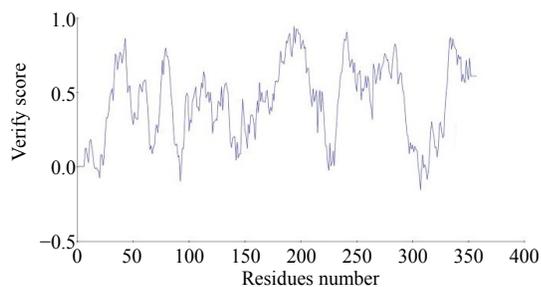
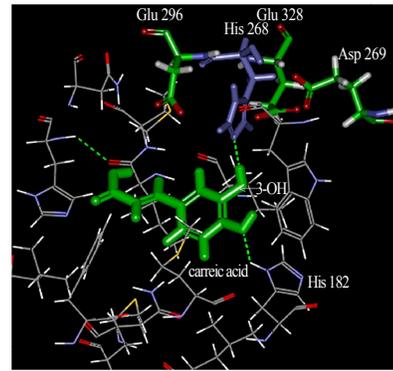


图 4 LCCOMT 优化模型的 Verify-3D 图  
Fig. 4 Verify-3D score of LCCOMT optimized model

键作用。分子对接结果发现，His268 位于 Glu296、Glu328 与 Asp269 等 3 个酸性氨基酸残基组成的“酸性口袋”中，并能够与咖啡酸的 3-OH 之间形成氢键。推测咖啡酸的 3-OH 在酸性环境中容易发生断裂，释放质子，导致咖啡酸的 3-O<sup>-</sup>离子（亲核基团），后者即与 SAM 的甲基发生甲基转移反应，形成阿魏酸（图 5）。



绿色小分子为咖啡酸；蓝色氨基酸残基为 His268；绿色氨基酸残基分别 Asp269、Glu296 和 Glu328  
Green molecule is caffeic acid; blue amino acid residues is His268; green amino acid residues are Asp269, Glu296, and Glu328 respectively

图 5 咖啡酸与 LCCOMT 的结合位点  
Fig. 5 Binding sites of caffeic acid with LCCOMT

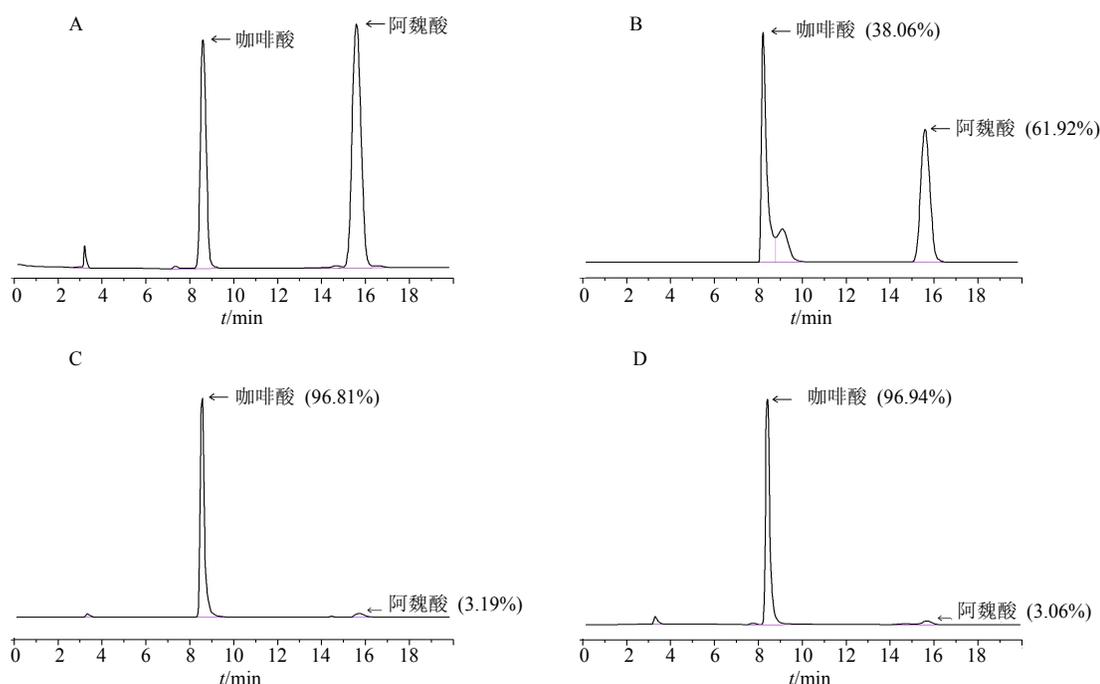
### 3.4 突变酶的活性检测

根据同源建模的结果，对该 His268 残基展开了定点突变的研究。活性检测结果如图 6 所示，反应 2 h 后，野生型 LCCOMT 能够高效地转化咖啡酸形成阿魏酸，其催化活力为 30.07 U/mg（图 6-B）。当 His268 分别突变为 Asn 与 Gln 后，催化活力仅为 1.55 U/mg 和 1.484 U/mg（图 6-C 与图 6-D）。相对于野生型 LCCOMT，活性分别下降了 94.85% 和 95.28%，这表明 His268 确为 LCCOMT 的关键氨基酸残基，其作为质子受体参与了 LCCOMT 的催化过程。

### 4 讨论

药用植物的次生代谢产物是众多中药的天然来源。发掘次生代谢产物合成基因并研究其功能，将为阐明次生代谢产物生物合成的分子机制，进而开展代谢调控奠定基础。阿魏酸具有较强的抗氧化与去除氧自由基的作用<sup>[13]</sup>，其作为治疗和预防神经退行性疾病、糖尿病和心血管疾病等药物的应用前景受到了广泛的关注。COMT 为阿魏酸合成途径的末端酶，对其编码基因展开代谢调控极有可能提高植物中阿魏酸的量<sup>[14]</sup>。

本实验首先通过同源建模获得了 LCCOMT 的三维模型。LCCOMT 的三维模型中含有 2 个重要的结构域，即蛋白二聚体结构域与催化结构域。分析苜蓿 COMT 的蛋白二聚化结构域发现，该结构域能够促进 COMT 单体的二聚化，提高 COMT 的稳定性<sup>[12]</sup>。分析不同植物来源氧甲基转移酶（OMT）的催化结构域，发现该区域中结合 SAM 的氨基酸残基保



A 为咖啡酸和阿魏酸对照品, B 为野生型蛋白, C 为 H268N 突变蛋白, D 为 H268Q 突变蛋白; 括号内为咖啡酸与阿魏酸的峰面积占比  
A: standard caffeic acid and ferulic acid; B: wild-type protein; C: H268N mutant protein; D: H268Q mutant protein; The peak area ratio of caffeic acid and ferulic acid was in parentheses

图 6 LCCOMT 的活性检测

Fig. 6 Enzyme activity assay of LCCOMT

守性较强, 结合底物的氨基酸残基保守性较差, 分析这与不同氧甲基转移酶具有不同的底物特异性有关<sup>[14]</sup>。根据 LCCOMT 与咖啡酸分子对接的结果, 推测 His268 是 LCCOMT 的关键氨基酸残基, 该残基作为质子受体, 能够诱导咖啡酸 3-OH 发生脱质子, 形成亲核性较强的 3-O<sup>-</sup>。定点突变实验进一步证实了 His268 确实在 LCCOMT 的催化过程中发挥了关键作用。Zubieta 等也发现查尔酮-O-甲基转移酶和异黄酮-O-甲基转移酶的 His 突变为 Leu、Asn、Gln 等氨基酸残基后, 其活性则彻底丧失, 这表明 His 在氧甲基转移酶分子结构中发挥了重要作用<sup>[15]</sup>。本实验所获得的 LCCOMT 的三维模型及定点突变结果将为认识 LCCOMT 的结构与功能的相互关系, 为固定化 LCCOMT 体外合成阿魏酸、LCCOMT 的转基因奠定了理论基础。

#### 参考文献

- [1] Ran X, Ma L, Peng C, *et al.* *Ligusticum chuanxiong* Hotr: a review of chemistry and pharmacology [J]. *Pharm Biology*, 2011, 49(11): 1180-1189.
- [2] Komél N, Lucas A, Karine R, *et al.* Identification of cholesteryl ester of ferulic acid in human plasma by mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1301: 162-168.
- [3] Justin E L, Tomas V, Bettina H, *et al.* Methyl jasmonate induces an O-methyltransferase in barley [J]. *Plant Cell Physiol*, 1997, 389(7): 851-862.
- [4] Noriko Y, Masako F M, Hiroaki O, *et al.* Molecular cloning and characterization of O-methyltransferases from the flower buds of *Iris hollandica* [J]. *J Plant Physiol*, 2008, 165(4): 415-422.
- [5] Li J J, Zhang G, Yu J H, *et al.* Molecular cloning and characterization of caffeic acid 3-O-methyltransferase from the rhizome of *Ligusticum chuanxiong* [J]. *Biotechnol Lett*, 2015, 37(11): 2295-2302.
- [6] 廖海, 周嘉裕, 张赶, 等. 一种酶法合成阿魏酸的方法: 中国, CN 104818300 A [P]. 2015-08-05.
- [7] Liu Z, Zhu Q, Li J, *et al.* Isolation, structure modeling and function characterization of a trypsin inhibitor from *Cassia obtusifolia* [J]. *Biotechnol Lett*, 2015, 37(4): 863-869.
- [8] Laskowski R A, MacArthur M W, Moss D S, *et al.* PROCHECK-a program to check the stereochemical quality of protein structures [J]. *J App Cryst*, 1993, 26(2): 283-291.
- [9] Bowie J U, Lüthy R, Eisenberg D, *et al.* A method to identify protein sequences that fold into a known

- three-dimensional structure [J]. *Science*, 1991, 253(5016): 164-170.
- [10] Zubieta C, He X Z, Dixon R A, *et al.* Structures of two natural product methyltransferases reveal the basis for substrate specificity in plant *O*-methyltransferases [J]. *Nat Struct Biol*, 2001, 8(3): 271-279.
- [11] Keller N P, Dischinger H C J, Bhatnagar D, *et al.* Purification of a 40-kilodalton methyltransferase active in the aflatoxin biosynthetic pathway [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(2): 479-484.
- [12] Zubieta C, Kota P, Ferrer J L, *et al.* Structural basis for the modulation of lignin monomer methylation by caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-*O*-methyltransferase [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(6): 1265-1277.
- [13] Kanski J, Aksenova M, Stoyanova A, *et al.* Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems *in vitro*: structure-activity studies [J]. *J Nutr Biochem*, 2002, 13(5): 273-281.
- [14] 李潞滨, 刘 蕾, 何聪芬, 等. 木质素生物合成关键酶基因的研究进展 [J]. *分子植物育种*, 2008, 5(11): 45-51.
- [15] Kaganr M, Clarke S. Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1994, 310(2): 417-427.