

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2017.04.035

八氢番茄红素脱氢酶的分子结构及其与达草灭相互作用分析

黄国周, 李圆圆, 邓鹏程, 白林含

(四川大学生命科学学院资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065)

摘要: 八氢番茄红素脱氢酶(Phytoene desaturase, PDS)是除草剂达草灭的靶点, 作者对野生型和两种定点突变型 PDS 的二维和三维结构进行预测, 并通过 DOCK6.5 进行 PDS 与达草灭的分子对接比较, 利用 Gromacs 进行分子动力学模拟, 使用 Amber9 中的 mm_pbsa.pl 分析能量分布及变化, 使用 LIGPLOT⁺ 软件进行氢键分析确认结合氨基酸位点. 结果表明突变对二维和三维结构无影响, 但是在达草灭存在的情况下, 突变的 PDS 有更高的结合能以及更弱的结合稳定性, 更难以与达草灭结合, 找到突变 PDS 蛋白对达草灭具有抗性的分子证据.

关键词: 八氢番茄红素脱氢酶; 达草灭; 分子动力学模拟; 抗性

中图分类号: Q518; Q811 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)04-0874-07

The molecular structure of phytoene desaturase and the analysis of the interaction between PDS and norflurazon

HUANG Guo-Zhou, LI Yuan-Yuan, DENG Peng-Cheng, BAI Lin-Han

(Key laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: Phytoene desaturase(PDS) is the target of the bleaching herbicide, norflurazon. The 2D and 3D structures of wild PDS and two mutations were achieved by online prediction, docking of PDS and norflurazon was carried out by DOCK6.5. Binding stability was analysed by molecular dynamics simulation via the software Gromacs. The energy changes and distribution were revealed by mm_pbsa.pl tools in Amber9. At last, important amino acids were confirmed by the analysis of hydrogen bond with LIGPLOT⁺. The results suggested that different mutations didn't change the 2D and 3D structures of PDS, but mutated PDS showed higher RMSD, which indicated lower binding stability, and higher binding energy, which indicated the difficulty to bind to norflurazon. Molecular evidence of mutated PDS resistance to norflurazon was found.

Keywords: Phytoene desaturase; norflurazon; molecular dynamics simulation; resistance

1 引言

为了解决转基因植物标记基因的安全问题, 新的技术逐步被开发出来. 安全标记基因技术, 主要

是通过筛选一些具有特定表征同时又没有安全隐患的基因作为标记基因. 宿主内源基因安全性高, 那些既能提高品质, 又具有特定表征便于筛选的基因成为研究热点.

收稿日期: 2016-04-20

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30970043)

作者简介: 黄国周(1990-), 男, 重庆万州人, 硕士研究生, 研究方向为生物工程学. E-mail: 2013222040181@stu.scu.edu.cn

通讯作者: 白林含. E-mail: bailinhan@scu.edu.cn

八氢番茄红素脱氢酶(Phytoene desaturase, PDS)基因是类胡萝卜素合成途径的关键基因^[9], PDS能催化八氢番茄红素脱氢形成 ζ -胡萝卜素,对后续色素合成途径提供原料^[10]. PDS催化反应除了需要底物外,还需要NADPH^[11],泛醌^[12],FAD^[13],ATP以及部分金属离子.由于PDS在光和系统中的重要作用,以PDS为作用靶点的除草剂也迅速研制出来,比如氟啶酮,达草灭,氟咯草酮等^[14].其中达草灭是使用最为广泛,效果也最为出色的一种^[15].达草灭的作用原理是与PDS必需的辅因子泛醌(PQ)竞争结合位点,从而抑制PDS催化反应.PDS有FAD和底物的结合区域,FAD是重要的辅酶,可以将电子传递给最终的受体PQ,而达草灭是与PQ竞争在FAD上的结合位点,达草灭结合上去后FAD无法继续传递电子,进而影响脱氢反应^[16].

研究发现,有一些对达草灭产生耐受能力的植物(多种藻类)^[17],其PDS基因均有不同程度的突变,突变位点多数都在第500个氨基酸以后.在我们的前期研究中,对盐藻PDS基因进行定点突变,获得L502R和L502F两种突变型.经大肠杆菌重组表达后发现突变蛋白具有达草灭抗性.

本文对野生型和两种突变型PDS的二维和三维结构进行预测,并与达草灭的分子对接比较、分子动力学模拟,阐明突变PDS蛋白抗达草灭的分子机理,为筛选植物内源安全标记基因提供依据.

2 材料和方法

2.1 材料

盐藻八氢番茄红素脱氢酶基因*Ds PDS*基因(NCBI登录号为GQ923693.1)由本室首次光除^[18];定点突变序列*Ds PDS-1*(L502R),*Ds PDS-2*(L502F)^[19]由本室构建并筛选;达草灭(Norfluorazon)分子结构件图1.

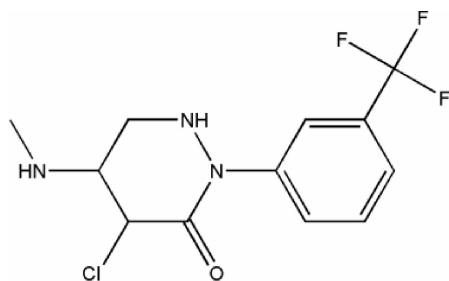


图1 达草灭分子结构

Fig.1 structure of norfluorazon

2.2 方法

2.2.1 结构的从头预测 使用MEGA6将*Ds PDS*基因(记为8H)以及定点突变序列*Ds PDS-1*(记为8H-R),*Ds PDS-2*(记为8H-R)进行翻译,采用了三级结构预测和二级结构预测相结合的方式.二级结构预测使用Psipred^[20]在线预测,三级结构的预测则是Phyre2^[21]在线预测.

2.2.2 分子对接 使用的是DOCK6.5^[22]软件检测不同突变型PDS蛋白与达草灭的结合能力.

2.2.3 分子动力学模拟(molecular dynamics simulation,MD) 使用gromacs4.5.5^[23]软件分析均方根偏差RMSD(root mean square deviation),均方根位移RMSF(root mean square fluctuation).

2.2.4 能量分解 采用MM/PBSA^[24](Molecular Mechanics/Poisson Boltzmann Surface Area(MM/PBSA))的方法,获得到RMSD平衡时间段的各氨基酸的能量贡献和蛋白-小分子复合物的结合自由能.

2.2.5 蛋白-配体(LIGPLOT)相互作用 通过LIGPLOT⁺^[25]软件来分析,揭示不同PDS不同氨基酸与达草灭的结合能力.

3 结果与分析

3.1 二级结构

图2是使用Psipred软件在线预测的结果图.二级结构预测结果显示PDS整体上有38% α 螺旋,19%的 β -折叠.其中突变位点502氨基酸处是一个 α -螺旋的开端,但是不同突变型二级结构完全一致,502处的突变并不改变二级结构.

3.2 三级结构

图3是PDS三维结构预测结果.由于蛋白质数据库没有PDS的晶体信息,使用其他蛋白作为模板预测.结果发现,尽管突变型在突变位点有不同的氨基酸,但整体三级结构仍然保持一致,并没有引起构象变化.PDS三级结构与预测结果中的c1s3bB_.2匹配度较高,即crystal structure of lsd2-npac,使用c1s3bB_.2作为预测的主要模板,序列对比为467个,覆盖率是82%,可信度是100%,分辨率为1.65Å.最后得到预测的PDS三维结构,进行后续结构分析.

3.3 Dock 结果

对靶蛋白分子进行处理,使用UCSF chimera软件^[26](1.8)中的DockPre工具实现的.去除靶蛋

白 PDB 文件中包含的其它小分子和水分子,无关紧要的金属离子等,然后给靶蛋白分子加上 H 原子及标准电荷,同时计算带电量.对要进行 docking 的小分子(达草灭)进行能量最小化.之后采用 UCSF DOCK(6.5)程序进行对接.利用的是允许配体柔性的柔性配体对接的方法.对接的位点是在设置的环境中小分子(达草灭)自动对接得到的,对接的参数是默认参数,在 select a subset of spheres to represent the binding site 过程中选择的是 cluster 1.最后的对接示意图显示为图 4.

结果显示,8H 型 grid score: -39.897511,8H-R 型 grid score: -37.825218,8H-F 型 grid score: -38.974731.野生型分子对接 grid 值最低,但基本相差不大,说明突变型蛋白和野生型蛋白与达草灭的分子结合效果相近,突变并不影响.

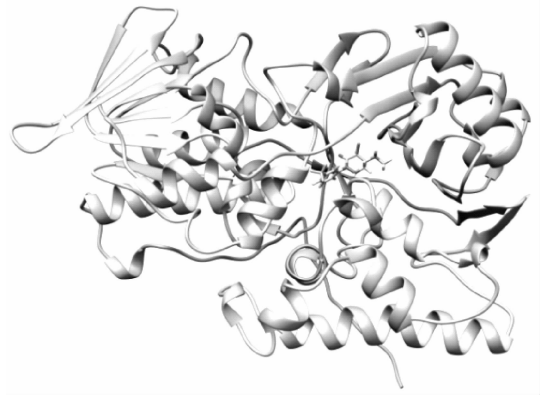


图 4 PDS 与达草灭分子对接示意图
Fig. 4 Docking of PDS and norflurazon

3.4 分子动力学分析

3.4.1 均方根偏差 RMSD(root mean square deviation)分析 为了研究达草灭与 PDS 蛋白结合的稳定性,进行了 RMSD 分析.从图 5 中可以看到,三个构象的 RMSD 值都小于 0.45,说明达草灭对三个构象的动力学结合是合理的.

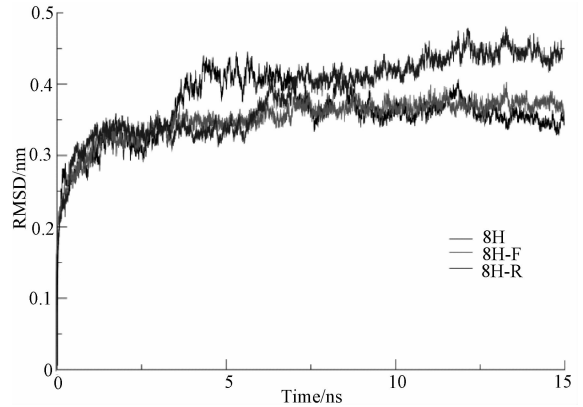


图 5 8H,8H-F,8H-R 的 15ns RMSD 分析
Fig. 5 RMSD analysis of 8H,8H-F,8H-R in 15ns

在 15ns 内,三个基因型都能实现先上升,然后波动,最后达到稳定.从平衡时间段来看,野生型(8H)和 8H-F 比 8H-R 具有更低的值,8H-F 相比 8H 在平衡阶段 RMSD 值更高,说明 8H-F 结合稳定性不如 8H,最后结合稳定性 8H>8H-F>8H-R,结果表明,野生型 PDS 结合达草灭的稳定性更强,可能会更易受到达草灭的影响,而突变型相比野生型,结合稳定性更差,受到达草灭的影响也更小.

3.4.2 均方根位移 RMSF (root mean square fluctuation)分析 为了进一步研究不同基因型 PDS 不同位置氨基酸在反应中的稳定性,了解个位置氨基酸的刚柔性,进行了平衡时间段的 RMSF 预测分析.从图 6 可以看出,有的区域波动

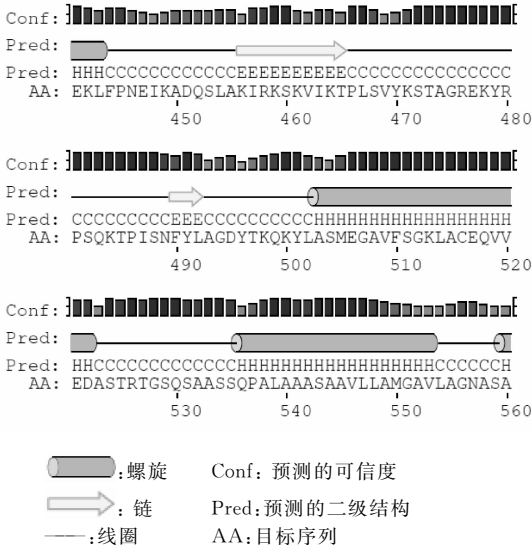


图 2 PDS 二级结构预测

Fig. 2 Secondary structure prediction of PDS



图 3 PDS 三级结构预测

PDS 三级结构的模板为氧化还原酶,胺氧化酶(含黄素) B 链.预测序列为 71~550 号氨基酸,覆盖率 82%

Fig. 3 3D structure prediction of PDS

很小,有的区域则出现不同程度的波动,其中两个突变型在多数位点波动情况更大,而野生型则波动不明显,与 RMSD 结果相符. 突变型在第 502 个氨基酸处波动较小,而 8H(野生型)在 502 处比另外两个基因型波动更小,说明其与达草灭结合后稳定性强于突变体,可能更容易受到达草灭影响.

3.4.3 二级结构变化 由于在 RMSF 分析中发现不少氨基酸有比较大的波动,因此接下来又对整体的二级结构变化做了分析,看不同位置氨基酸波动对整体二级结构的影响. 图 7 反映的是在平衡时间段二级结构的变化,纵坐标表示氨基酸位置,横坐标是模拟时间.可以看出,在模拟过程中,有的氨基酸区域二级结构变化会有明显的变化,其中 8H 比较稳定,只在第 200, 350 氨基酸处有明显的变化,而 500 左右处也有一定的变化. 而 8H-F, 8H-R 则在更多的位置上具有更大的变化. 说明野

生型比突变型结合更稳定,这个结果与 RMSD, RMSF 结果相符.

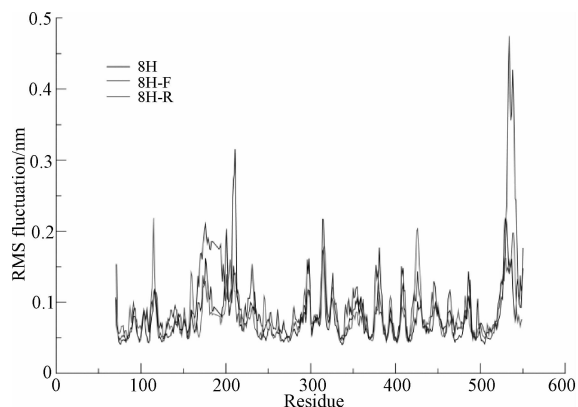


图 6 8H,8H-F,8H-R 与达草灭复合物中骨架原子的 RMSF 分析

Fig. 6 RMSF of the backbone atoms versus residue number of 8H-Norflurazon, 8H-F-Norflurazon, 8H-R-Norflurazon complexes

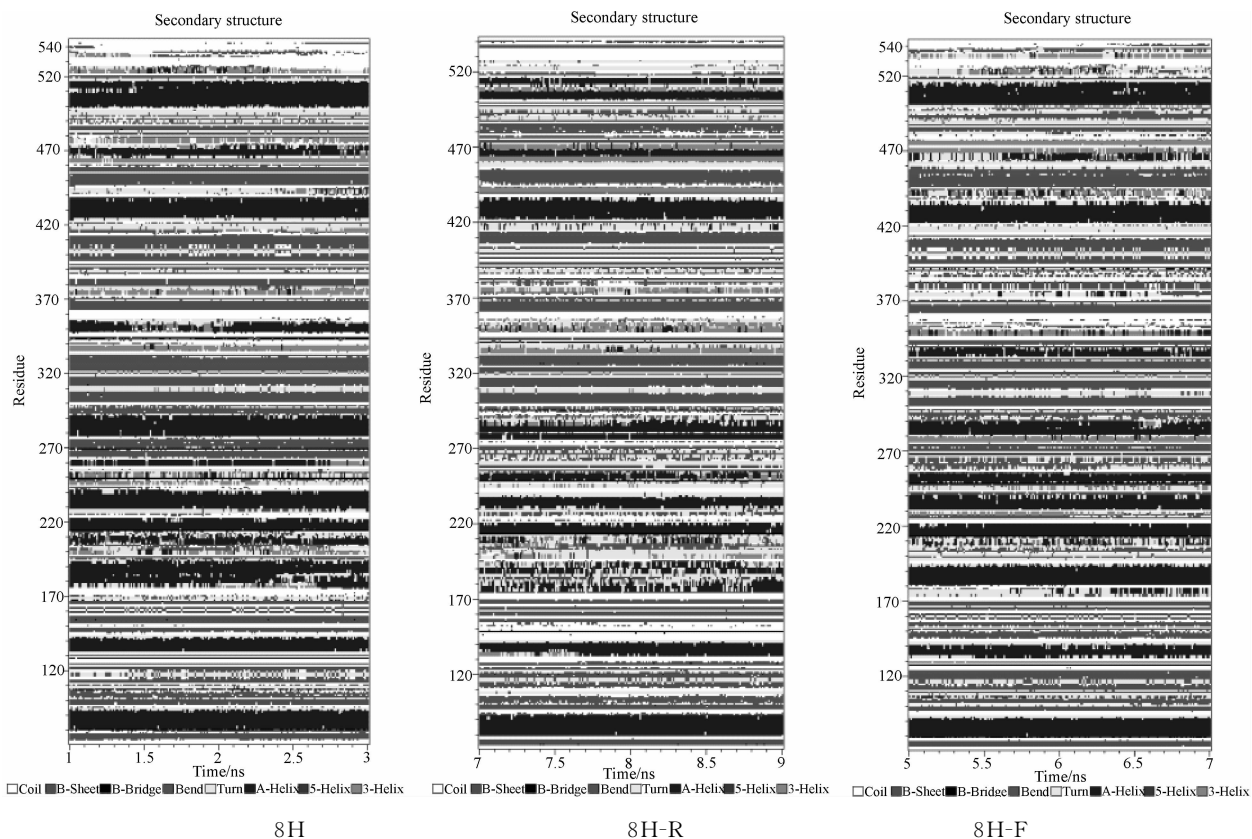


图 7 MD 过程中 PDS 二级结构变化

Fig. 7 PDS secondary structural changes during MD

3.4.4 氢键分析 为了进一步研究可能与达草灭作用的氨基酸位点,进行了氢键分析,定位与达草灭结合相关的氨基酸位点.把相互作用的三维结构转化成二维的图,可以确定最重要的作用位点.从图 8 发现在 124,275,402,415 这几个位点都有较

强的结合,不同突变型有不同的氨基酸的位置和类别,但位置差异并不大,在三维结构中差距也不大(图 9),都与 502 氨基酸相差较远.说明 502 氨基酸处没有结合位点,达草灭可能并不是直接结合到 502 氨基酸处,但 502 处的改变可能会影响达草灭

的结合.

3.4.5 能量分析 能量分解采用 MM/PBSA (Molecular Mechanics/Poisson Boltzmann Surface Area (MM/PBSA)) 的方法,可得到 RMSD 平衡时间段的各氨基酸的能量贡献和蛋白-小分子复合物的结合自由能,获得关键氨基酸的能量贡献有助于更好地了解配体与受体之间的结合机制.使用

Amber 9 数据包中的 g_mmpbsa.pl 工具计算结合自由能^[27]. 这包括以下几个部分:范德华力(ΔE_{vdw})、静电力(ΔE_{ele})、去溶剂化极性能(ΔG_{solv})和去溶剂化非极性能(ΔG_{SASA}). 可以用下面的公式表示:

$$\Delta G_{bind} = \Delta E_{vdw} + \Delta E_{ele} + \Delta G_{sol} = \Delta E_{vdw} + \Delta E_{ele} + \Delta E_{solv} + \Delta G_{SASA}$$

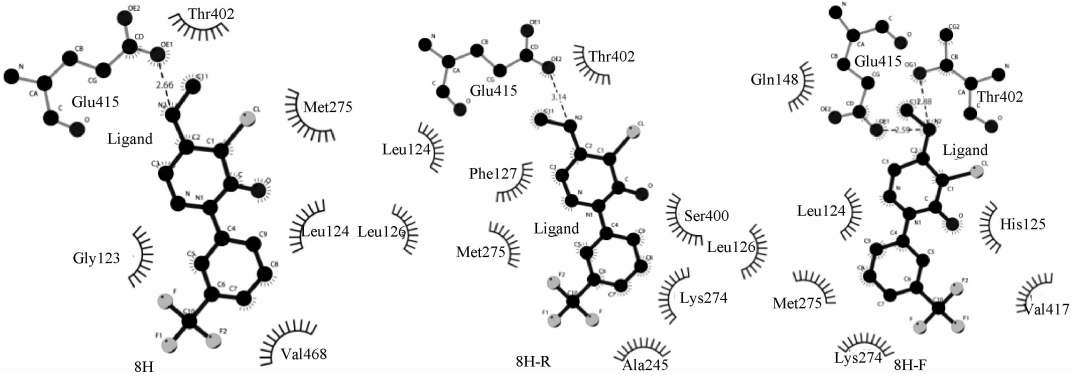


图 8 野生型和突变型 PDS 和达草灭结合的氢键分析

Fig. 8 Hydrogen bond of wildtype-PDS and L502R/L502F with norflurazon

表 1 用 MM/PBSA 方法预测的结合自由能

Tab.1 Predictive binding energy via MM/PBSA

Protein	E_{vdw} (kJ/mol)	E_{ele} (kJ/mol)	E_{solv} (kJ/mol)	G_{SASA} (kJ/mol)	G_{bind} (kJ/mol)
PDS	-112.751±10.468	-581.627±29.158	-396.409±27.569	-15.777±0.866	-313.746±28.175
PDS-F	-120.160±8.660	-305.584±22.211	-297.334±38.985	-16.284±0.650	-144.694±24.305
PDS-R	-152.039±9.558	-255.646±20.435	-298.274±21.446	-15.764±0.637	-125.175±19.585

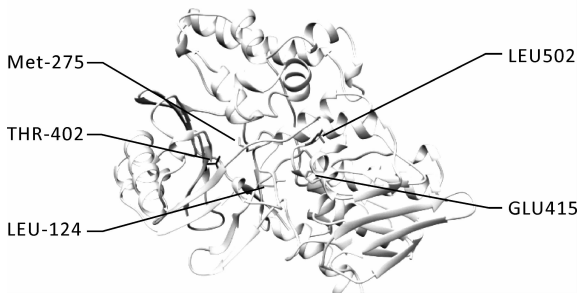


图 9 蛋白-达草灭复合物结合位点的关键氨基酸

Fig.9 Key amino acids in binding sites of the protein-norflurazon complexes

表 1 中,结合自由能为 ΔG_{bind} ,受体与配体之间的范德华力 ΔE_{vdw} ,静电相互作用 ΔE_{ele} ,溶解自由能 ΔE_{sol} , ΔE_{SASA} 指通过溶解可接近表面(SASA)计算的非极性贡献能.

从 ΔG_{bind} 来看,其中 8H 的结合能是-313.746KJ/mol,8H-F 是-144.694KJ/mol,8H-R 是-125.175KJ/mol,也说明了 8H 最容易结合,其次是两个突变型.值得注意的是, ΔG_{bind} 的主要来源

是 ΔE_{ele} ,其次是 ΔE_{vdw} . ΔE_{sol} 是主要的阻力来源,正值的 ΔE_{solv} 会阻碍 PDS 和达草灭的结合,而 ΔE_{ele} 又比 ΔE_{solv} 大,可以抵消掉这部分作用力.最终野生型具有最强的结合达草灭的能力,与上文 RMSD,RMSF 结果类似.

为了进一步了解 PDS 和达草灭的相互作用,接下来又做了氨基酸能量分解,研究不同位置氨基酸和达草灭的作用及对结合的能量贡献.

3.5.6 氨基酸能量分析 图 9 显示,野生型 PDS 和两个突变型稍有不同,无论是从氨基酸位置还是作用能量上都有区别,但是差的不多,而两个突变型则更为接近.起主要作用的氨基酸主要是 Lys, Arg, Asp, Glu 等,与氢键预测结果相似,这些氨基酸可能是达草灭与 PDS 结合的重要氨基酸.如果对这些能量贡献较大的氨基酸进行突变,可能会对 PDS 与达草灭的结合产生显著影响,有可能会提高 PDS 对达草灭的抗性,从而得到更适合做筛选标记的 PDS,从而为进一步的 PDS 改造提供位点信息.

4 讨 论

由于 PDS 蛋白的特殊性, 目前还没有得到其确切的三维结构, 因此无法采用同源模拟分析的方法, 只好采用从头预测得到其二维和三维结构. 由于预测匹配度较高, 因此结果可靠. 分子对接发现突变型和野生型 PDS 没有明显差距, 这不是抗性产生的原因.

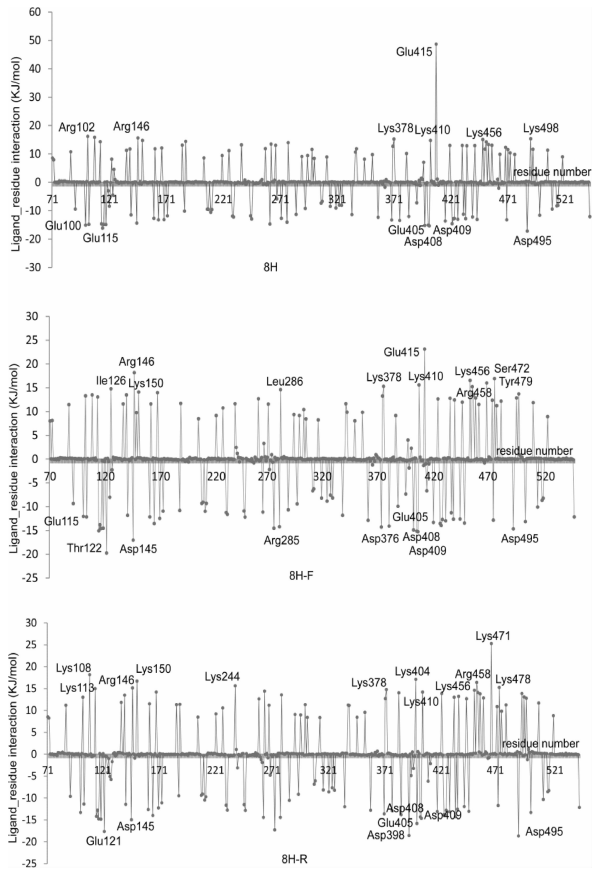


图 10 各个位置氨基酸能量分析

Fig. 9 Energy analysis of different amino acids

在后续的 MD 试验中, RMSD 显示野生型和达草灭体系整体稳定性最好, 其次是 8H-F, 最后是 8H-R, 说明野生型更容易结合达草灭, 可能受到的影响更大. 而 RMSF 和二级结构变化同样显示野生型 PDS 与达草灭结合更稳定, 有可能是 PDS 与达草灭的结合会影响底物或者 FAD 的结合, 从而抑制 PDS 活性, 而突变型则不易结合. 由于突变发生在 502 处, 初步推测在 502 氨基酸附近有酶活中心.

但氢键分析发现与达草灭结合紧密的氨基酸并不包括 502 处, 但主要集中区域在三维结构上离 502 处都比较近, 502 处的变化可能会间接影响达草灭结合位点.

最后能量分析发现, 达草灭是可以结合到 PDS 上的, 这是之前的研究没有涉及的. 而野生型结合能更低, 有更强的结合能力, 结合达草灭后受到的影响可能更大.

之前的研究发现达草灭的抑制是通过与辅因子 PQ 竞争性地结合 FAD, 进而阻断电子传递链, 影响脱氢反应. 而在达草灭与 PDS 的结合上并没有相关研究, 本文的研究发现, 达草灭同样可以结合到 PDS 上, 结合能力的强弱产生了耐受差异, 该发现进一步完善了达草灭和 PDS 相互作用的机理, 为进一步的改造提供了依据.

参考文献:

- [1] Chamovitz D, Sandmann G, Hirschberg J. Molecular and biochemical characterization of herbicide-resistant mutants of cyanobacteria reveals that phytoene desaturation is a rate-limiting step in carotenoid biosynthesis [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268: 17348.
- [2] Liu J, Gerken H, Huang J, *et al.* Engineering of an endogenous phytoene desaturase gene as a dominant selectable marker for *Chlamydomonas reinhardtii* transformation and enhanced biosynthesis of carotenoids [J]. *Process Biochem*, 2013, 48: 788.
- [3] Breitenbach J, Changfu Zhu A, Sandmann G. Bleaching Herbicide Norflurazon Inhibits Phytoene Desaturase by Competition with the Cofactors [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 5270.
- [4] Norris S R, Barrette T R, Dellapenna D. Genetic dissection of carotenoid synthesis in arabisopsis defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation [J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 2139.
- [5] Dailey T A, Dailey H A. Identification of an FAD Superfamily Containing Protoporphyrinogen Oxidases, Monoamine Oxidases, and Phytoene Desaturase [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 13658.
- [6] Chamovitz D, Pecker I, Sandmann G, *et al.* Cloning a gene coding for norflurazon resistance in cyanobacteria [J]. *Z Naturforsch C*, 1990, 45: 482.
- [7] Boger P, Sandmann G. Carotenoid biosynthesis inhibitor herbicides-mode of action and resistance mechanisms [J]. *Pesticide Outlook*, 1998, 9: 29.
- [8] Gemmecker S, Schanb P, Koschmieder J, *et al.* Phytoene Desaturase from *Oryza sativa*: Oligomeric Assembly, Membrane Association and Preliminary 3D-Analysis [J]. *PloS One*, 2015, 10: e0131717.

- [9] Huang J, Liu Jin, Li Y T, *et al.*, isolation and characterization of the phytoene desaturase gene as a potential selective marker for genetic engineering of the astaxanthin-producing green alga *Chlorella zofingiensis* (chlorophyta)[J]. *J Phycol*, 2008, 44: 684.
- [10] Chen C, Han B L, Rong Q D, *et al.* Cloning and expression study of a putative carotene biosynthesis related (cbr) gene from the halotolerant green alga *Dunaliella salina*. [J]. *Mol Biol Rep*, 2007, 35: 321.
- [11] 周峰, 黄非, 白林含. 盐藻 PDS 基因的同源克隆及在大肠杆菌中的表达[J]. *微生物学报*, 2015, 55: 149.
- [12] Buchan D W, Minnici F, Nugent T C, *et al.* Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: W349.
- [13] Kelley L A, Mezulis S, Yates C M, *et al.* The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis[J]. *Nat Protoc*, 2015, 10: 845.
- [14] Allen W J, Balius T E, Mukherjee S, *et al.* DOCK 6: Impact of new features and current docking performance[J]. *J Comput Chem*, 2015, 36: 1132.
- [15] Pronk S, Páll S, Schulz R, *et al.* GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29: 845.
- [16] Hou T J, Wang J, Li Y Y, *et al.* Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods; II. The accuracy of ranking poses generated from docking [J]. *J Comput Chem*, 2011, 32: 866.
- [17] Laskowski R A, Swindells M B. LigPlot⁺: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery [J]. *J Chem Inf Model*, 2011, 51: 2778.
- [18] Yang Z, Lasker K, Schneidman-Duhovny D, *et al.* UCSF Chimera, MODELLER, and IMP: An integrated modeling system[J]. *J Struct Biol*, 2012, 179: 269.
- [19] Salomon-Ferrer R, Case D A, Walker R C. An overview of the Amber biomolecular simulation package[J]. *WIREs Comput Molsci*, 2013, 3:198.
- [20] Liu J, Sun Z, Gerken H, *et al.* Genetic engineering of the green alga *Chlorella zofingiensis*: a modified norflurazon-resistant phytoene desaturase gene as a dominant selectable marker [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98: 5069.