Thiobacillus thioparus 菌株中硫氰酸水解酶生信分析

刘刚兵　范嘉勋　程　静

四川轻化工大学　四川宜宾　643000

【摘　要】硫氰酸水解酶γ亚基和腈水合酶α亚基同属一个超家族结构域，具有高度同源性。硫氰酸水解酶除了具有水解硫氰酸的活性外，同时也可能具有降解腈类物质的活性，然而在有关于硫氰酸水解酶的研究规模与质量上，皆不如腈水合酶。为了进一步探究硫氰酸水解酶的功能和作用，故通过腈水合酶α亚基特征序列（CTLCSC）为探针，从 NCBI 上筛选硫氰酸水解酶的蛋白序列，最终筛选出一个来自 Thiobacillus thioparus 菌株的硫氰酸水解酶，并对其蛋白序列进行生信分析。分析显示该基因编码 243 个氨基酸，相对分子质量为 27.53kD，为亲水性稳定蛋白，存在丝氨酸、酪氨酸和苏氨酸磷酸化位点，含有 NHLP 先导肽结构域，整体结构域与腈水合酶α亚基同属于 thiocyan_alph 超家族，蛋白二级结构由α螺旋（37.45%）、延伸链（11.11%）β转角（4.53%）、无规则卷曲（46.91%）构成，无跨膜螺旋区、信号肽，为细胞质酶，预测硫氰酸水解酶的理化性质，分析与腈水合酶催化口袋的差异，为后续研究提供一定参考。

【关键词】硫氰酸；硫氰酸水解酶；腈水合酶；生信分析；多序列比对

引言

硫氰酸盐（SCN-）是一种含碳、氮和硫的中毒性化合物，一般情况下由自然（制氰植物）和工业（冶金、焦炭生产、肥料）通过还原硫化合物进行氰化物解毒的过程释放到环境中[1][2]。硫氰酸盐作为一种难挥发、有毒的水体污染物，主要以-S-C≡N 和-N=C=S 互变异构的形式存在，其化学性质稳定，它具有完全还原的硫原子，它可以被自养硫氧化细菌用作电子供体，也可以被一些异养细菌用作氮源，其降解机制都需要酶的催化。硫氰酸水解酶（SCNase）是一种主要来自于硫杆菌属的含钴酶，能催化硫氰酸盐降解，按照其作用化学键的不同可分为在腈（C≡N）上降解和碳硫键（C-S）上降解，对应的酶学分类分别为 EC 3.5 和 EC 3.13。因此，硫氰酸主要有两种降解途径[3][4]：

（1）COS 途径：通过断裂腈（C≡N）生成中间产物羰基硫化物和铵根离子，中间产物羰基硫化物进一步水解生成硫化氢和二氧化碳。

$$N \equiv C - SX^- - 2HX_2O \longrightarrow O - C - S - NHX_3 - OHX^-$$

$$O = C = S - HX_2O \longrightarrow HX_2S - COX_2$$

（2）CNO^-途径：通过断裂碳硫键（C-S）生成中间产物氧化腈和硫化氢，氧化腈进一步水解生成铵根离子和二氧化碳。

$$N \equiv C - SX^- - HX_2O \longrightarrow N \equiv C - OX^- - HX_2S$$

$$N \equiv C - OX^- - 2HX_2O \longrightarrow NHX_3 - COX_2 - OHX^-$$

两种途径虽然断裂不同的化学键，但其产物都为二氧化碳、硫化氢、铵根离子，降低了硫氰酸的毒性，且硫化氢、铵根离子是化能自养菌常见的电子供体和电子受体，能进行硫化作用和硝化作用，使其进一步降解[5]。

与硫氰酸水解酶同属一个超酶家族的腈水合酶是催化腈类物质生成对应的酰胺的一种金属酶，其在序列和结构上都与硫氰酸水解酶有很高的相似性，其一是编码硫氰酸水解酶的 a，β，γ亚基与由 a，β亚基组成的腈水合酶有很高的序列相似性[6]。二是硫氰酸水解酶和钴型腈水合酶活性中心都含有低自旋三价非吓啉结构的钴。三是硫氰酸水解酶与腈水合酶活性中心都含有三个半胱氨酸，其中一个氧化为半胱氨酸-次磺酸，另一个氧化为半胱氨酸-亚磺酸，与钴离子形成独特的金属配位结构[7]。

虽然两者活性中心都存在钴配位结构且与有很高的序列相似性，但大多数研究表明硫氰酸水解酶催化硫氰酸盐底物，而腈水合酶催化腈类底物，他们只作用于各自的底物，活性并不互通。但 2023 年吴桐与其科研团队发现了一种兼具硫氰酸水解酶和腈水合酶活性的新型降解酶来自于玫瑰单胞菌 Roseomonas stagni，这是迄今为止发现的第一个活性互通的天然腈类降解酶[7]。

因此本研究采用生物信息学的方法从腈水合酶的保守序列出发，发掘作用于腈键的硫氰酸水解酶，以此找出潜在能够降解腈类底物的活性互通酶，并结合 ProtParam、ProtScale、SignalP 5.0 Server、NetPhos 2. 0 Server

等生物信息学软件，对其氨基酸序列分别进行理化性质、序列分子进化、亲水或疏水性、二级结构、功能域、信号肽以及蛋白的磷酸化等方面进行分析和预测，为下一步探索更多具有双功能活性的酶、酶分子改造、基因工程菌的构建、表达等奠定基础。

1 材料与分析方法

1.1 分析材料

腈水合酶亚基和硫氰酸盐γ亚基有高度同源性，在对腈水合酶的相关研究中，对其a亚基的序列比较分析结果可知，腈水合酶a亚基的特征序列为CTLCSC，硫氰酸盐大多来自于硫杆菌科，以腈水合酶a亚基的特征序列为探针，以硫杆菌科为背景，在NCBI上BLAST。

1.2 分析方法

使用Expasy上的ProtParam tool（https：//web.expasy.org/protparam/）对该蛋白进行理化性质的分析、使用Expasy上的protscale（https：//web.expasy.org/protscale/）在线工具对该蛋白进行亲水与疏水性分析、使用DTU Health Tech上的NetPhos（https：//services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/）工具对该蛋白进行磷酸化位点分析、使用Technical University of Denmark开发的DeepTMHMM（https：//services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/）工具对该蛋白进行跨膜区域的预测、使用DTU Health Tech的SignalP－5.0（https：//services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/）工具对该蛋白进行信号肽预测与分析、使用PSORTb v.3.0（https：//www.psort.org/psortb/）工具对该蛋白进行亚细胞定位、使用NCBI-CD在线工具（https：//www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi）对该蛋白进行保守结构域分析、使用PRABI-GERLAND的SPOMA（https：//npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa%20_sopma.html）工具对该蛋白进行二级结构的预测与分析、使用Expasy上的SWISS-MODEL（https：//swissmodel.expasy.org/）工具对该蛋白质进行三级结构预测并分析、使用NCBI上的Basic Local Alignment Search Tool（https：//blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）对该蛋白进行同源性分析，使用CLUSTALW（https：//www.genome.jp/tools-bin/clustalw）在线工具进行比对，将对比结果使用ESPript 3.0在线工具（https：//espript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/index.php）查找保守序列。

2 结果与分析

2.1 硫氰酸水解酶γ亚基蛋白质序列查询

NCBI上BLAST，最终只筛选出一个具有完整蛋白结构的硫氰酸水解酶，来自于Thiobacillus thioparus（硫代硫杆菌）（NCBI的登录号为SCNC_THITI，UniProtKB/Swiss-Prot的登录号为O66188.3）。

在NCBI上进一步查询得硫氰酸水解酶γ亚基的蛋白序列：

MSADHDHDHDHDHDHKPAPMVEEVSDFEILEMAVRELAIEKGLFSAEDH
RVWKDYVHTLGPLPAARLVAKAWLDPEYKKLCIEDGVEASKAVGVNWVT
SPPTQFGTPSDYCNLRVLADSPTLKHVVVCTLCSCYPRPILGQSPEWYRSPN
YRRRLVRWPRQVLAEFGLQLPSEVQIRVADSNQKTRYIVMPVRPEGTDGW
TEDQLAEIVTRDCLIGVAVPKPGITVNAKRPVLKANRPVHHDH

表1　不同氨基酸的数目及比例

Tab 1　Number and proportion of different amino acids

氨基酸	数目	比例
Ala（A）	18	7.4%
Arg（R）	17	7.0%
Asn（N）	6	2.5%
Asp（D）	18	7.4%
Cys（C）	6	2.5%
Gln（Q）	7	2.9%
Glu（E）	16	6.6%
Gly（G）	11	4.5%
His（H）	12	4.9%
Ile（I）	9	3.7%
Leu（L）	20	8.2%
Lys（K）	12	4.9%
Met（M）	4	1.6%
Phe（F）	4	1.6%
Pro（P）	21	8.6%
Ser（S）	12	4.9%
Thr（T）	11	4.5%
Trp（W）	6	2.5%
Tyr（Y）	7	2.9%
Val（V）	26	10.7%
Pyl（O）	0	0.0%
Sec（U）	0	0.0%

2.2 硫氰酸水解酶γ亚基的理化预测

使用ProtParam tool对该蛋白基因进行预测，结果显示：该基因共编码243个氨基酸，硫氰酸水解酶理论相对分子质量为27.53kD，理论等电

点为 6.17，分子式为 $C_{1225}H_{1913}N_{349}O_{355}S_{10}$，带负电荷的残基总数（Asp+Glu）为 34，带正电荷的残基总数（Arg+Lys）为 29，该蛋白带负电荷，脂肪指数是计算球状蛋白脂肪族氨基酸侧链所占相对体积，反映了蛋白质的热稳定性，为 84.98，不稳定指数为 58.38，可以把单独存在的硫氰酸水解酶 γ 亚基归类为不稳定的蛋白亚基，亲水性平均值（GRAVY）：-0.428，初步表明硫氰酸水解酶 γ 亚基是一种不稳定亲水蛋白。不同氨基酸的数目即比例见表 1，可知整个硫氰酸水解酶中 Ala（A）数目最多，占比 10.7%，其次是 Pro（P），占比 8.6%，其余氨基酸占比均小于 8.0%，其中 Met（M）和 Phe（F）的数目最少，为 1.6%。

2.3 氰酸盐水解酶 γ 亚基的亲/疏水分析

因氨基酸的亲水性与疏水性是构成蛋白折叠的主要驱动力之一，因此蛋白质亲水性分布图可反映蛋白质的折叠情况。使用 Prot Scale 软件中的 Hydropath./Kyte&Doolittle 标度分析酶的疏水性。当氨基酸的打分值大于 0，表示疏水，正值越大，疏水性越强；负值表示亲水，负值越小，表示亲水性越强。利用 protscale 工具在线分析硫氰酸水解酶的亲/疏水情况，结果图 1 所示：其最大亲水值为 2.489，位于第 129 个氨基酸处，最小亲水值为-3.411 位于第 12 个氨基酸处，宏观来看整个硫氰酸水解酶亲水部分多于疏水部分，是一种亲水酶。

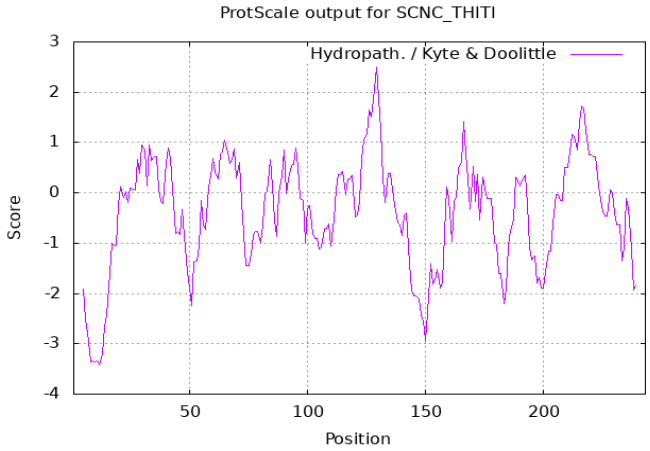

图 1　硫氰酸水解酶亲/疏水性图谱

Fig1　Hydrophilic/hydrophobicity profile of thiocyanate hydrolase

2.4 硫氰酸水解酶 γ 亚基的磷酸化分析

蛋白质的磷酸化是通过酶促反应将磷酸基团转移到蛋白组氨基酸残基上的过程，在生物体内普遍存在，磷酸化是蛋白质翻译后的一种修饰，是一种动态的生物调节过程，与 DNA 损伤修复、转录调节、信号传导、细胞凋亡的调节等生物学功能密切相关。了解磷酸化位点，有助于我们深入了解蛋白质的功能和调控机制。在蛋白质中磷酸化多肽主要指肽链中的 Ser、Tyr 和 Thr 残基的侧链羟基被修饰成酸式磷酸酯多肽。现由 NetPhos 对该蛋白亚基进行预测，如图所示硫氰酸水解酶 γ 亚基存在 9 个丝氨酸磷酸化位点，3 个苏氨酸磷酸化位点，4 个酪氨酸磷酸化位点，推测硫氰酸水解酶 γ 亚基由丝氨酸磷酸化为主。

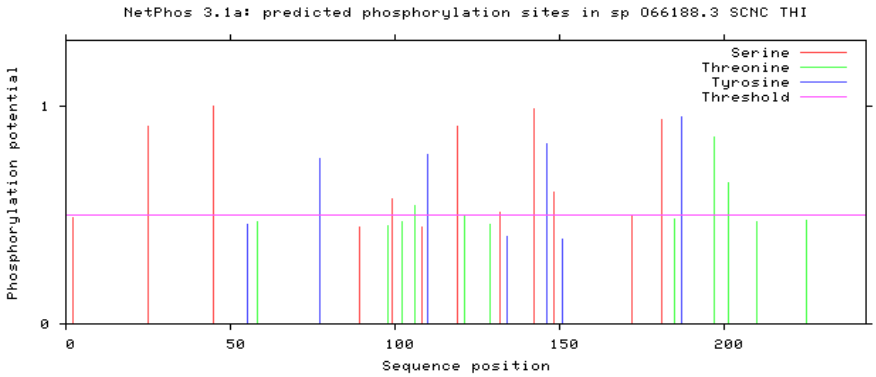

图 2　硫氰酸水解酶磷酸化位点图谱

Fig 2　Mapping of phosphorylation sites of thiocyanate hydrolase

2.5 对硫氰酸水解酶γ亚基的跨膜区域预测

使用 Technical University of Denmark 开发的 DeepTMHMM 工具对该蛋白进行跨膜区域的预测，结果显示：硫氰酸水解酶γ亚基不存在跨膜区域，说明不是定位在生物上的膜的膜蛋白。

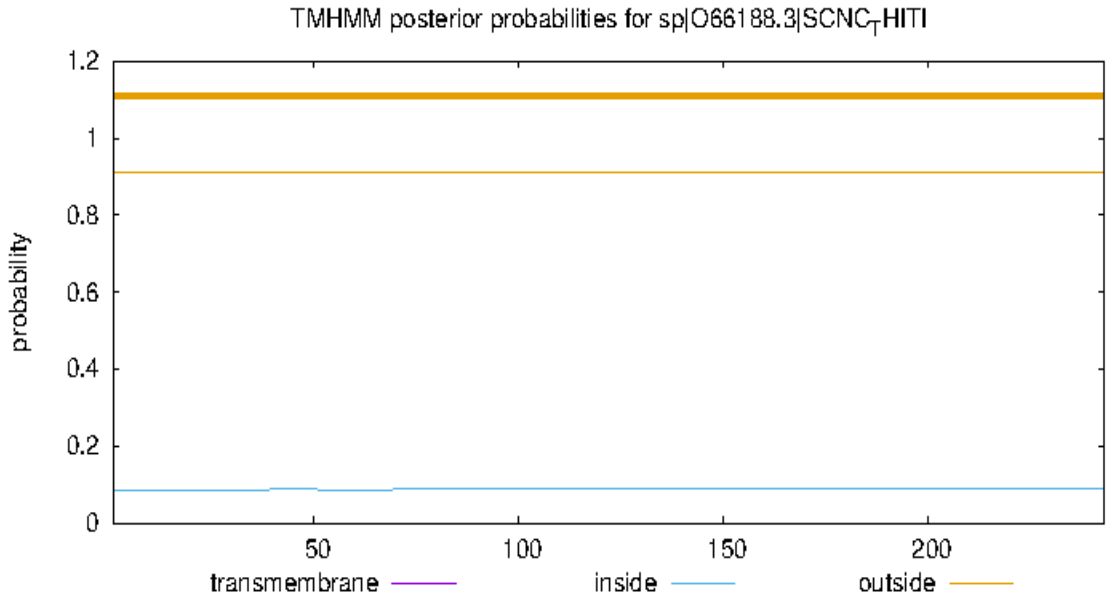

图 3　硫氰酸水解酶跨膜蛋白的预测

Fig 3　Prediction of thiocyanate hydrolase transmembrane proteins

2.6 硫氰酸水解酶γ亚基的信号肽预测

利用在线软件“Signal5.0”对大豆基因蛋白信号肽进行分析，由于 Thiobacillus thioparus 菌株属于革兰氏阴性菌，故在选择菌种时选择革兰氏阴性，分析显示：硫氰酸水解酶γ亚基不存在信号肽，推测可能是共翻译转运途径。

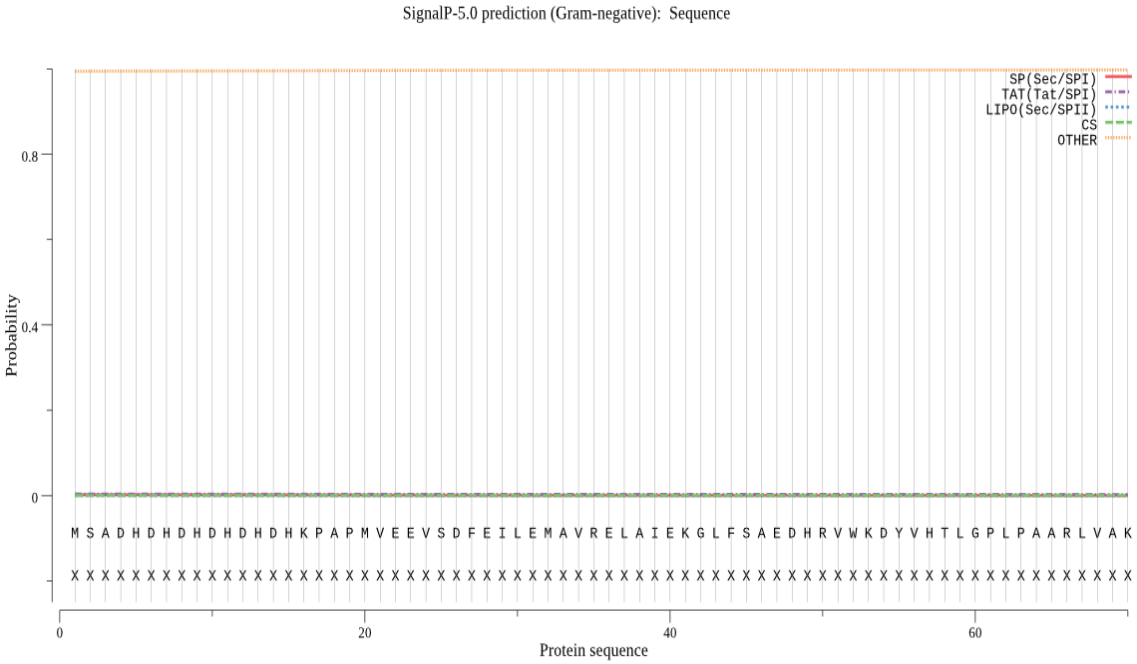

图 4　硫氰酸水解酶信号肽的预测

Fig4　Prediction of thiocyanate hydrolase signal peptide

2.7 硫氰酸水解酶γ亚基的亚细胞定位

使用 v.3.0 工具对该蛋白进行亚细胞定位，结果显示：细胞质得分为 8.96、细胞质膜为 0.51、周质空间为 0.26、外膜为 0.01、胞外为 0.26，综合预测硫氰酸水解酶γ亚基定位在细胞质，综合跨膜区域和信号肽的分析，硫氰酸水解酶γ亚基在细胞质中合成，等待和其他亚基一起组装折叠成成熟的蛋白质。

2.8 硫氰酸水解酶γ亚基的保守结构域预测

利用 NCBI-CD 对该蛋白进行结构域分析结果为，含有 NHLP 先导肽结构域，其代表了在大量假定的核糖体天然产物（RNP）前体（包括噻唑/噁唑修饰的微蛋白（TOMM））中保守的结构域。并且在硫氰酸水解酶γ亚基的结构域分析出了腈水合酶α亚基的结构域，两者具有很高的相似性，属于同一 thiocyan_alph 超家族。

2.9 硫氰酸水解酶γ亚基的二级结构与三级结构预测分析

通过使用 PRABI-GERLAND 的 SPOMA 工具对该蛋白进行二级结构的预测与分析，结果如图 5、图 6 显示该蛋白二级结构由α螺旋、延伸链、β转角、无规则卷曲构成，在蛋白氨基酸中占比分别为 37.45%、11.11%、4.53%、46.91%。

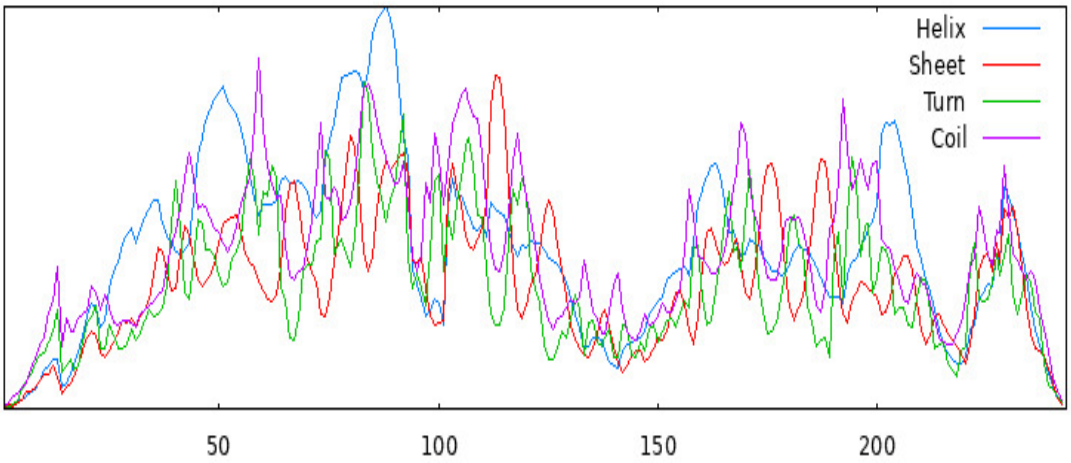

图 5　二级结构预测分数曲线

Fig 5　Curve of predicted scores for secondary structures

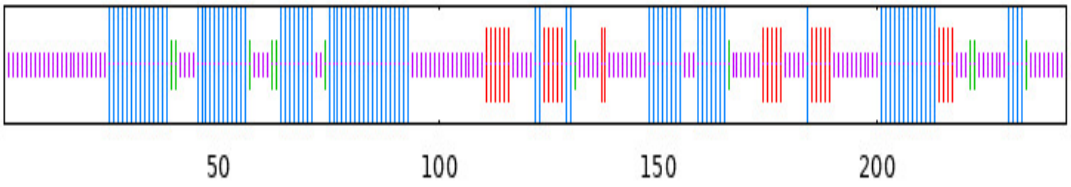

图 6　二级结构的可视化预测

Fig 6　Visual prediction of secondary structure

使用 Expasy 上的 SWISS-MODEL 工具对该蛋白质进行三级结构预测并分析，结果如图 7 显示：其三级结构模型构建以 3vyg.1.C 硫氰酸水解酶突变体 R136W 的晶体结构为模板构建，序列同源性为 99.59%，与二级结构分析基本一致。GMQE 值（全球性模型质量估测）为 0.91，建模质量良好。

通过 uniprot 分析发现，硫氰酸水解酶是由α亚基，β亚基，γ亚基组成异源三聚体，再通过β亚基的 N 端相互作用构成杂十二聚体，如图 8 所示。在此基础上每个异源三聚体含有一个钴原子，其 Co^{3+} 与γ亚基上的第 128 位、第 131 位、第 133 位的半胱氨酸和在第 132 位的丝氨酸相结合，再与其他七个 Arg 残基共同构成硫氰酸水解酶的催化口袋。

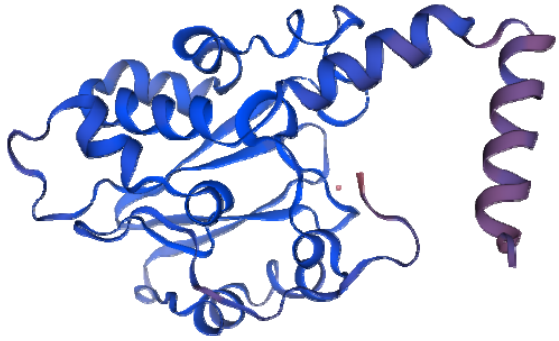

图 7　硫氰酸水解酶的空间三级结构

Fig 7　Spatial tertiary structure of thiocyanate hydrolase

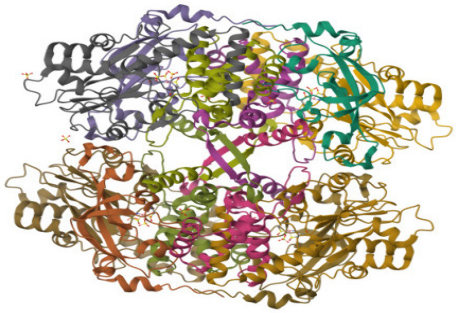

图 8　由（α β γ）异源三聚体构成的杂十二聚体的硫氰酸水解酶的空间构象

Fig 8　Heterodecamerization of the heterodimer composed of（α β γ）heterotrimeric space conformation of thiocyanate hydrolase

而腈水合酶是由 α，β 两个亚基构成的铁型或钴型金属酶，其也可以组成异源二聚体、异源四聚体、异源六聚体等。其中 α 亚基与腈水合酶的 γ 亚基有高度同源性，但硫氰酸水解酶和腈水合酶往往催化底物不互通。

硫氰酸水解酶在三级结构中的 β Arg90 和 γ Arg136 在底物选择性中起着关键作用，因 Arg 为碱性氨基酸，β 亚基 Arg90、γ 亚基 Arg136 和其他五个 Arg 残基使 Co3+中心上方的分子表面呈高度正电荷。相比之下，腈水合酶金属中心的顶部有一个疏水簇，富含诸如丙氨酸、亮氨酸、缬氨酸等的疏水氨基酸，从而使腈水合酶口袋呈现疏水性。当硫氰酸水解酶在底物结合袋中的单个 Arg 残基被疏水残基取代之后，硫氰酸水解酶不再拥有水解 SCN-的催化活性，而表现出腈水合酶的活性。但是催化口袋的疏水性与否、是否带正电荷不是决定二者催化差异的决定性因素。在野生型硫氰酸水解酶的口袋空间中，其内在的催化口袋空间足够能使 SCN-与 Co3+ 中心配位，但其催化口袋的大小小于腈离子，导致腈离子无法进入，无法被催化水解。但突变型硫氰酸水解酶中，γ Arg136 被替换成 γ Trp136，由于构象的改变，扩大了 Co3+中心上方的空间，使腈离子能进入突变型的口袋，使其具有腈类底物催化活性。同时在野生型硫氰酸水解酶中，β Arg90 和 γ Arg136 能捕获 Co3+中心顶部的 SCN-离子，促进随后的水解。

3 结论

硫氰酸水解酶与腈水合酶有相似的催化活性，在对腈水合酶的研究中，已分离出一个既对硫氰酸盐有催化活性，又对腈类物质有催化活性的腈水合酶，本研究以腈水合酶 a 亚基特征序列（CTLCSC）为探针，筛选出了一个来自于 Thiobacillus thioparus 的硫氰酸水解酶，该酶可能也具有硫氰酸、腈类物质底物互通的双活性，以期能够催化腈类物质，处理腈类物质带来的啥啥危害本研究通过生物信息学工具及其方法对 Thiobacillus thioparus 菌株的硫氰酸水解酶 γ 亚基蛋白基因进行分析，结果表明，该基因共编码 243 个氨基酸，理论相对分子质量为 27.53kD，理论等电点为 6.17，属于亲水性的不稳定蛋白，亚细胞定位显示 Thiobacillus thioparus 菌株的硫氰酸水解酶 γ 亚基定位于在细胞质中。信号肽分析显示，Thiobacillus thioparus 菌株的硫氰酸水解酶 γ 亚基存在不信号序列，说明该蛋白不参与跨膜转运，分析应是共翻译转运途径。分析发现该蛋白存在 NHLP 先导肽结构域结构域，同时与腈水合酶 α 属于同一结构域。其二级结构主要 α 螺旋（37.45%）、延伸链、（11.11%）β 转角（4.53%）、无规则卷曲（46.91%）构成，采用 swiss-model 进行同源建模，结果表明，Thiobacillus thioparus 菌株的硫氰酸水解酶 γ 亚基和 3vyg.1.C 硫氰酸水解酶突变体 R136W 的晶体结构相似性非常高，同时分析发现硫氰酸水解酶催化口袋上带正电荷，会影响底物的选择性，同时在三级结构中的 β Arg90 和 γ Arg136 的空间构象在硫氰酸水解酶的底物选择性中起着关键作用。

参考文献：

[1]印猛.工业用腈水合酶的催化性能改造[D].江南大学，2023.

[2]吴桐，程中一，周哲敏.一种兼具腈水合酶活性与硫氰酸水解酶活性的新型腈类降解酶[J].食品与发酵工业，2023，49（24）：97-102.