

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

L-離胺酸氧化酶基因表現、生理活性與蛋白質結構功能之 研究 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型

計畫編號：NSC 97-2313-B-040-005-

執行期間：97年08月01日至98年07月31日

執行單位：中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系(所)

計畫主持人：賴雯玲

計畫參與人員：大專生-兼任助理人員：陳意超

大專生-兼任助理人員：譚恩琪

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

中華民國 98年10月31日

行政院國家科學委員會專題研究計畫期末報告

L-離胺酸氧化酶基因表現、生理活性與蛋白質結構功能之研究

計畫編號：NSC 97-2313-B-040 -005 -

執行期限：2008 年 08 月 01 日至 2009 年 07 月 31 日

執行單位：中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系

計畫主持人：賴雯玲 E-mail : wllai@csmu.edu.tw

一、中文摘要

氧化酶與脫氫酶在醫學及工業分析等方面應用價值極大，L-胺基酸氧化酶利用氧化酶的特性，可用來作為各種 L-胺基酸之定量分析。L-離胺酸氧化酶 (L-lysine oxidase, LKO) 自土壤分離菌之麩皮(wheat bran)固體培養基中分離純化所得，為分泌型的糖蛋白質，在原本的母株中表現量偏低，且在生產 LKO 需進行麩皮固體醱酵，母株菌體才能分泌此酵素，對於自動化生產極為不利。本計畫將此酵素的基因選殖於不同的宿主中，希望能夠建立一套能夠大量生產，且易於純化的酵素生產系統。

本實驗利用生物資訊、結構資訊與蛋白質譜儀等結果，陸續預測訊息序列切位可能為 L18、V87 以及 E8，利用 pET-24d 以及 pPICZ α A 作為載體，分別選殖於原核表現系統 *E. coli* BL21(DE3) 以及真核表現系統 *Pichia pastoris* KM71，加上完整基因，共構築 8 個重組基因。另外將完整的 LKO 基因序列選殖於 pPICZB 載體中，送進同屬於真菌的 *Pichia pastoris* KM71 中進行表現，以期 *Pichia pastoris* KM71 可辨認其訊息序列，並進一步反應將重組蛋白分泌於菌體外。初步結果顯示以 E8 起始的序列，在原核系統可表現，但無酵素活性，推測可能是因為原核表現系統，缺乏 LKO 需要的轉譯後修飾所致。取誘發表現 5 小時的 24d-KO8 菌液，進行純化測試，結果重組蛋白似乎不會與親和性管柱 Ni-NTA 膠體結合。此外，利用 pPICZ α A 作為載體的重組基因，皆無法成功表現於菌體外。

關鍵詞：L-lysine oxidase (LKO)、結構資訊、蛋白質譜儀、pET-24d、pPICZ α A、pPICZB、*Pichia pastoris*

Abstract

L-Amino acid oxidases (LAAOs) have received attentions as potential diagnostic reagents and industrial biocatalysts. L-lysine oxidase (LKO) was a glycoprotein purified from filamentous fungi-*Trichoderma* cultured in wheat bran-containing solid medium. The LKO expression from *Trichoderma* was low and need solid culture. This is unfavorable for automatic production. Therefore we cloned the LKO gene to prokaryotic and yeast expression systems, expect to establish a great quantity expression and easy purification procedure.

In this study, we used bioinformation, structure bioinformation and LC-MS-MS results to predict the digestion sites of signal peptide were L18, V87 and E8 in succession. This 3 gene fragments and full gene length were cloned to *E. coli* BL21(DE3) and *Pichia pastoris* KM71 respectively using pET-24d and pPICZ α A vectors. Altogether we constructed 8 recombinants. Besides, we cloned LKO full gene length to pPICZB vector which not containing signal peptide. We expect *Pichia pastoris* KM71 can recognize the signal peptide of LKO and secret the protein to medium. The results showed the recombinant protein start from E8 could be expressed by prokaryotic system but without enzyme activity. It is suggested that the result from prokaryotic expression system lacking posttranslational modification. The recombinant proteins from 24d-KO8 strain induction 5 hours cannot be purified using affinity column. Furthermore, the recombinants using with pPICZ α A vector all cannot express the proteins to medium successfully.

Key word : L-lysine oxidase (LKO), structure bioinformation, LC-MS-MS, pET-24d, pPICZ α A, pPICZB, *Pichia pastoris*

二、緣由與目的

氧化酶與脫氫酶在醫學檢驗及工業分析等方面應用價值極大，L-胺基酸氧化酶利用氧化酶的特性，可用來作為各種 L-胺基酸之定量分析，如 L-離胺酸氧化酶可檢測 hyperlysinemia 病患血液中之 L-離胺酸濃度；且在食品及醱酵工業上，L-離胺酸常用於豬飼料的添加，以醱酵生產 L-離胺酸可達 350000 公噸，所以 L-離胺酸之定量分析也是一項重要工作。利用酵素電極或網版印刷電極 (screen-printed electrodes) 可連續地偵測 L-離胺酸之濃度，可使檢驗成本下降，操作更方便[1]。而基質特異性好的 L-phenylalanine oxidase 可用來檢測 phenylketonuria (PKU) 病人血液及尿液中 phenylalanine 之含量。專一性及穩定性良好的 L-glutamate oxidase 可應用於調味品、醱酵食品中及醬油釀造工業等對 L-glutamate 的含量分析。

L-離胺酸氧化酶(L-lysine oxidase, LKO) 自土壤分離菌 *Trichoderma pseudokoningii* Ts75-2 之麩皮(wheat bran)培養基中分離純化所得。經純化該酵素並研究其基質專一性後證實為一全新的酵素，其分子量為 116,000，由兩個分子量約為 58,000 之次單位所組成，每一個次單位與一個 FAD 結合，最適反應 pH 值範圍為 5.0~9.0。若此酵素對 L-lysine 活性為 100，則對 L-ornithine、L-phenylalanine、L-arginine、L-tyrosine、L-histidine 等之活性分別為 18.0 : 9.0 : 9.7 : 7.3 : 4.5。其對紅血球癌細胞株(mouse erythroleukemic cell line) IW201 及 IW32.4.1 也具毒殺作用，發現對 IW32.4.1 細胞株之毒性較強，其 ID₅₀ 為 0.2 mU/ml，而對 IW201 則為 0.4 mU/ml [2]。

Trichoderma spp. 是種土壤中常見的黴菌，可生產許多種抗生物質，除此之外，也可寄生在其他的黴菌上，藉著菌絲纏繞或是分泌酵素，溶解寄主細胞壁，繼而使用寄主的養分，使寄主最終衰殘、死亡，此為 mycoparasitism，所以可以利用 *Trichoderma* spp. 作為微生物防制(biocontrol)之用[3]。而 LKO 是唯一從真菌所分離出具有毒殺作用的氧化酶，而此酵素對於 *Trichoderma* spp 之生理活性為何，仍舊未解，值得進一步探討，或許有更嶄新的利用價值。

LKO 為分泌型的糖蛋白質，在原本的母株中表現量偏低，但是要大量取得純化酵素依舊困難。且在生產 *T. pseudokoningii* 之 LKO 需進行固體醱酵，因為必須將此菌培養於麩皮固體培養基中，*T. pseudokoningii* 菌體才能分泌此酵素，對於自動化生產極為不利。本計畫希望能夠將此酵素的基因選殖於不同的宿主中，希望能夠建立一套能夠大量生產，且易於純化的酵素生產系統。

二、結果與討論

1. 訊息序列切位之預測

由於 LKO 蛋白質 N 端被修飾，無法讀取其 N 端序列，所以無法推論其訊息序列有多長，受限了 LKO 重組基因的構築。LKO 並不具有利用典型的訊息序列，因此利用 SignalP 3.0 [4]、SIGFIND [5] 與 SIG-Pred (http://bioinformatics.leeds.ac.uk/prot_analysis/Signal.html) 等軟體皆無法預測出訊息序列切位。另根據 Jan A. Veenstra 所提出的 monobasic 與 dibasic 的訊息序列切位原則[6]，預測 LKO 可能的切位有 2 個；一個位於 R17，另一個位於 R86。其中 R17 的切位會使 N-extension 區域很長(70 a.a.)，而 R86 的切位緊接 FAD-binding domain 的第一個 2 級結構(β 1)，表示 LKO 將缺失 N-extension 區域，如果此蛋白仍具有生物毒殺活性，則 LKO 可能有不同的調控機制。

另外從原菌株純化 Native 蛋白，並進行 SDS-PAGE 電泳分析，將含有 LKO 蛋白的膠體切出，以 Lys-C 進行 in gel digestion 將蛋白萃取出來，進一步利用質譜儀(LC-MS-MS)分析胜肽序列，同時也在無任何蛋白酶作用下，分析任意撞擊斷裂的胜肽序列，結果得到最靠近 N 端的序列為 A15(圖一)。在自然界中有大量的蛋白其 N 端被修飾，最常見的形式包括 acetyl, formyl, pyroglutamyl groups [7]，分析 A15 附近的序列與二級結構，發現位在一個 α -helix 中(圖二)，而此 α -helix 的開端可能為 glutamate (E8)，可行成常見的 pyroglutamate 的修飾型態，因此推測 E8 可能為第一個胺基酸。

2. 基因選殖

除了上述所預測的 E8、R17 與 R86 這 3 個可能的切位外，認為 LKO 的訊息序列應該很短，可能不致於影響蛋白的結構，因此將完整基因序列、E8、L18 與 V87 分別選殖於原核表現系統(*E. coli*)以及真核表現系統(*Pichia pastoris*)。大腸桿菌是目前使用最廣泛的蛋白質表現系統，由於使用最久，對其基因瞭解清楚，所建立的系統最為完整。使用大腸桿菌表現系統來表現酵素可進一步利用 methionine auxotroph strain (*E. coli* B834 (DE3)) 表現含重金屬的蛋白質，以利未來蛋白晶體結構解析。*P. pastoris* 是一種嗜甲基酵母菌(methylotrophic yeast)，可在缺乏抑制性碳源(repressing carbon source)如葡萄糖的情況下利用甲醇來當碳源，維持其細胞內的正常生理機能。酒精氧化酶(alcohol oxidase)可催化甲醇氧化成甲醛(formaldehyde)和過氧化氫(hydrogen

peroxide), 利用酒精氧化酶 AOX1 啟動子, 能使 *Pichia* 大量製造重組蛋白, 可占細胞內水溶蛋白的 30% 以上[8]。在製造重組蛋白上, 本系統有以下四點優點: (1) 基因操作技術類似 *S. cerevisiae*, 易於操作。(2) 可大量產生胞內或胞外之重組蛋白質。(3) 具有糖基化作用及轉譯後修飾作用。(4) 容易擴大培養, 且不需要昂貴的添加物, 節省經費。

由於 LKO 為分泌型蛋白, 加上其 N 端結構可能會影響其生理活性, 因此選擇 pET-24d 以及 pPICZ α A 作為載體, 分別是 *E. coli* 與 *Pichia pastoris* 的表現載體, 二者的 6xHis tag 皆位於 C 端, 可幫助蛋白偵測與純化, 但不影響蛋白本身可能的功能。其中 pPICZ α A 載體具有 α -factor 作為訊息序列, 可將表現的蛋白分泌於菌體外, 對於未來的蛋白純化非常有利。

此實驗將完整基因序列、E8、L18 與 V87 分別選殖於 pET-24d 以及 pPICZ α A 兩種載體中, 因此獲得 8 種構築體(constructs), 分別命名為 24d-preKO、24d-KO8、24d-KO18、24d-KO87 以及 aA-preKO、aA-KO8、aA-KO18、aA-KO87(表一)。將選殖於 pET-24d 的重組基因送進 *E. coli* BL21(DE3) 表現; 而選殖於 pPICZ α A 的重組基因則送進 *E. coli* TOP10F' 大量複製, 再將此質體切成直線後, 重新送入 *P. pastoris* KM71 使進行 homologous recombination 而嵌入宿主染色體, 以確保重組基因穩定存在宿主內。

LKO 雖不具有典型的訊息序列, 但 LKO 來自於真菌, 為了確認其訊息序列的位置, 將完整的 LKO 序列選殖於 pPICZB 載體中, 送進同屬於真菌的 *Pichia pastoris* KM71 中進行表現, 以期 *Pichia pastoris* KM71 可辨認其訊息序列, 並進一步反應將重組蛋白分泌於菌體外, 反之 *Pichia pastoris* KM71 若無法辨識其訊息序列, 則蛋白會表現於菌體內, 因此所構築之重組基因命名為 ZB-preKO。

3. 重組蛋白之表現

(1) 原核系統

將帶有重組基因之 *E. coli* BL21(DE3), 利用 IPTG 進行誘導表現, 並取誘導表現 3 到 5 小時的菌液進行分析。利用 SDS-PAGE 與 Western blot 偵測酵素表現情形, 結果 24d-KO18 與 24d-KO87 則無明顯的表現訊號, 推測可能破壞到蛋白的結構完整性, 而影響其表現或蛋白穩定性。而 24d-KO8 與 negative control (含 pET-24d 載體的菌株) 相比, 有一條明顯的 major band, 且

分子量介於 52kDa 與 93kDa 之間，符合預期的分子量，利用 anti-his tag antibody 偵測也獲得相同結果（圖三 A）。然活性測試結果皆偵測不到酵素活性，推測可能是因為 LKO 為醣蛋白，需要轉譯後修飾，不適合原核表現系統，同時也顯示醣基化修飾的不可或缺性。

另外取誘發表現 5 小時的 24d-KO8 菌液，以超音波震盪破菌後，利用 Ni-NTA agarose (Invitrogen) 進行親和力純化測試，結果似乎不會與 Ni-NTA 膠體結合（圖三 B）。

(2) 真核系統

pPICZ α A 的重組基因是以 AOX1 為啟動子，*S. cerevisiae* 之 α -factor 為訊息胜肽，利用甲醇誘導蛋白表現。乃各挑選數個成功轉型株，以振盪培養初步比較其表現情形，利用三角錐瓶振盪培養此菌體，先以 100ml BMGY 培養液（以甘油為碳源）增幅菌量，收下菌體，再加入 1/10 體積之 BMMY 培養液（methanol 當碳源）誘導蛋白表現並持續 3-5 天，收下培養液，並以蛋白濃縮管將培養液濃縮 5-10 倍進行分析。初步結果顯示，aA-preKO、aA-KO8、aA-KO18、aA-KO87 皆無酵素活性，而 SDS-PAGE 與 Western blot 亦偵測不到訊號（圖四），顯示蛋白並未成功表現於菌體外。

四、目前正進行的工作

1. 確認 24d-preKO 菌株的表現情形與酵素活性分析
2. 將 24d-KO8 蛋白從 SDS-PAGE 上切下進一步利用質譜儀確認其身份
3. 確認 aA-preKO、aA-KO8、aA-KO18、aA-KO87 等菌株，誘發表現後，重組蛋白是否表現於菌體內。
4. 確認 ZB-preKO 菌株的表現情形與酵素活性分析

五、參考文獻

1. Olschewski, H., et al., 2000. Screen-printed enzyme sensors for L-lysine determination. *Enzyme Microb. Technol.*, 26: 537-543.
2. Hu, H.M., et al., 1994. Purification and characterization of L-lysine oxidase from *Trichoderma pseudokoningii* and its effect on growth of mouse erythroleukemia cells. *J. Chin. Agric. Chem. Soc.*, 32: 361-371.
3. Harman, G.E., et al., 2004. *Trichoderma* species--opportunistic, avirulent plant

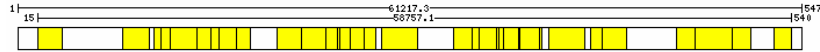
symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2: 43-56.

4. Bendtsen, J.D., et al., 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.*, 340: 783-95.
5. Reczko, M., et al., *Finding Signal Peptides in Human Protein Sequences Using Recurrent Neural Networks* Lecture Notes in Computer Science. Vol. 2452. 2002, Heidelberg: Springer 60-67.
6. Veenstra, J.A., 2000. Mono- and dibasic proteolytic cleavage sites in insect neuroendocrine peptide precursors. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 43: 49-63.
7. Mozdzanowski, J., et al., 1998. High-yield deblocking of amino termini of recombinant immunoglobulins with pyroglutamate aminopeptidase. *Anal. Biochem.*, 260: 183-187.
8. Cereghino, J.L. and J.M. Cregg, 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24: 45-66.

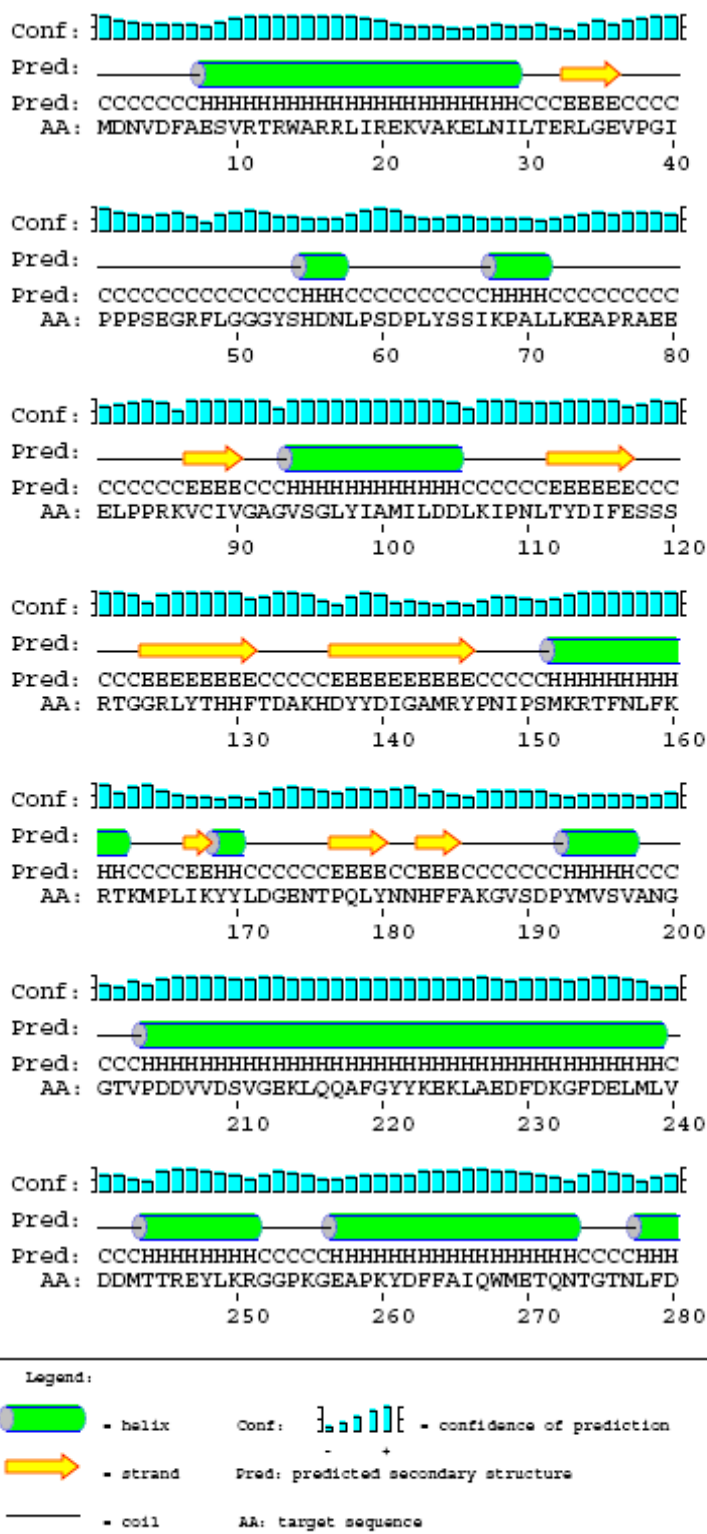
>gi133332416|KOD

MDNWDAESV RTRWARRLIR EKVAKELNIL TERLGEVPGI PPPSEGRFLG GGYSHDNLPS DPLYSSIKPA LLKEAPRAEE
ELPPRKVCIV GAGVSGLYIA MILDDLKIPN LTYDIFESSS RTGGRLYTHH FTDKHDYYD IGAMRYPNIP SMKRTFNLFK
RTKMPLIKYY LDGENTPQLY NNHFFAKGVS DPYMVSVANG GTVPDDVVDS VGEKLQQAFG YYKEKLAEDF DKGFDLMLV
DDMTTREYLK RGGPKGEAPK YDFFAIQWME TQNTGTNLFQ QAFSESVIDS FDFDNPTKPE WYCIEGGTSL LVDAMKETLV
HKVQNNKRVD AISIDLDAPD DGNMSVRIGG KDHSGYSTVF NTTALGCLDR MDLRGLNLHP TQADAIRCLH YDNSTKVALK
FSYPWWIKDC GITCGGAASD DLPLRRCVYP SYNLDDTGEA VLLASYTWSQ DATRIGSLVK EAPPQPPKED ELVELILQNL
ARLHAEHMTY EKIKEAYTGV YHAYCWANDP NVGGAFALFG PGQFSNLYPY LMRPAAGGKF HIVGEAF

Mass (mono): 61217.3 Identifier: gi133332416 Database: C:/Xcalibur/database//Hypocrea-long.fasta
Protein Coverage: 373/547 = 68.2% by amino acid count, 42015.9/61217.3 = 68.6% by mass

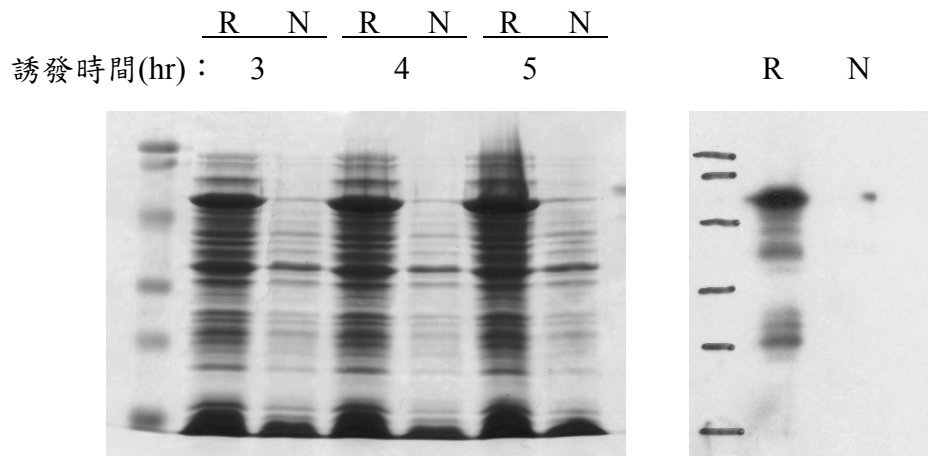


圖一、蛋白質譜儀(LC-MS-MS)分析結果，在無任何蛋白酶作用下，分析任意撞擊斷裂的胜肽序列，紅色為比對分析到的序列片段。

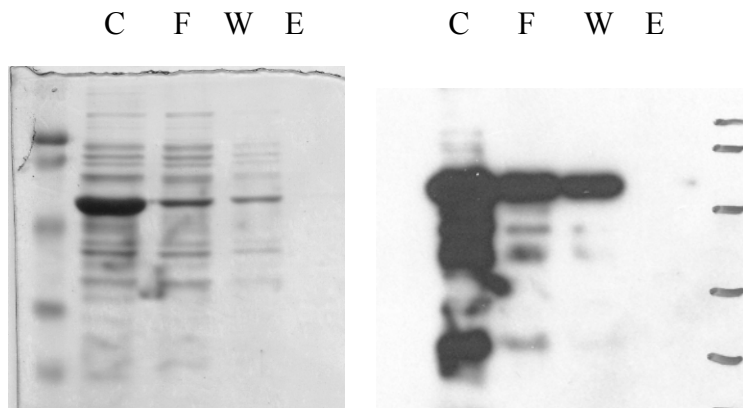


圖二、LKO 蛋白二級結構預測結果，在此只列出 N 端前 280 個氨基酸序列

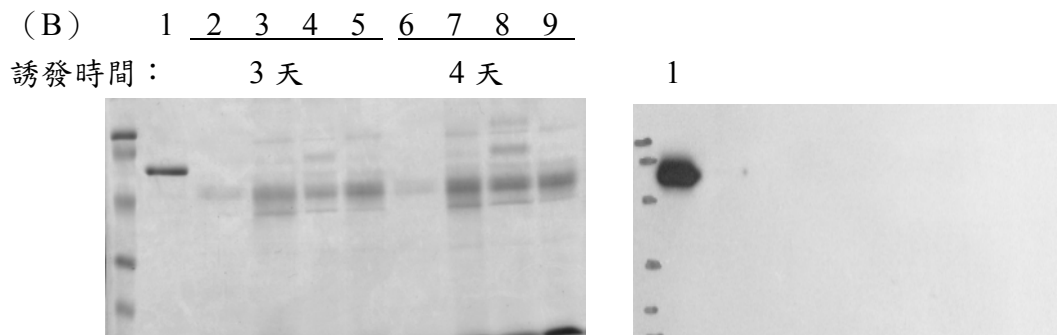
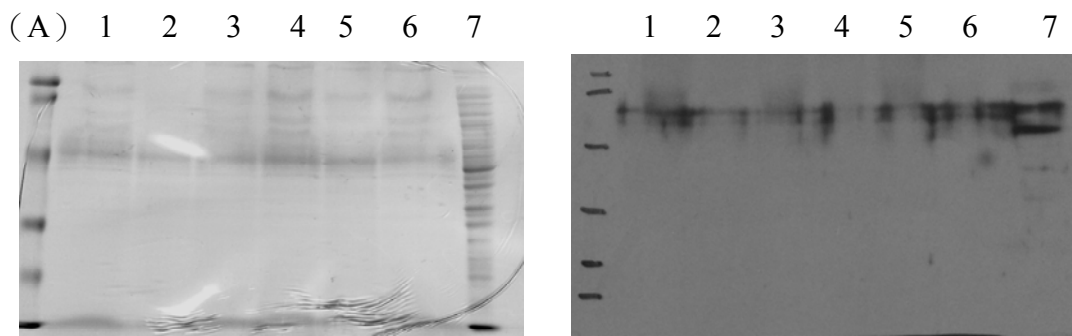
(A)



(B)



圖三、24d-KO8 菌株表現分析；(A)圖左為 LKO 重組菌株(R)與 negative control(只含載體的菌株；N)，IPTG 誘發表現後所有蛋白之 SDS-PAGE 分析。圖右為誘發表現 3 小時後之 Western blot 分析。(B) 圖為 IPTG 誘發表現 5 小時後，進行親和性純化分析，C: crude extract, F: flowthrough, W: wash (20mM imidazole), E: elute (300mM imidazole)，圖左為 SDS-PAGE 分析，圖右為 Western blot 分析。



圖四、aA-KO 菌株表現分析；(A) 圖為 aA-KO18 與 aA-KO87 誘發表現 4 天後，取 10 倍濃縮上清培養液進行 SDS-PAGE 分析(左)與 Western blot 分析(右)，lane1~5: aA-KO18, lane6: aA-KO87, lane7: positive control(含有 His-tag protein 之 E. coli 菌液)。(B)圖為 aA-preKO 與 aA-KO8 誘發表現後，取 10 倍濃縮上清培養液進行 SDS-PAGE 分析(左)與 Western blot 分析(右)，lane1: positive control(含有 pPICZaA-goox 之 P. pastoris KM71 上清培養液),lane2-3: aA-preKO, lane 5:aA-KO8。