

行政院國家科學委員會補助
大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫名稱：原核與真核尿囊素水解酵素的比較：金屬結合位與轉譯
* 名稱：羧化後修飾之分析 *
* ***** *

執行計畫學生：何雅燁
學生計畫編號：NSC 101-2815-C-040-025-B
研究期間：101年07月01日至102年02月28日止，計8個月
指導教授：黃晟洋

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 102年03月28日

目錄

目錄.....	I
圖&表目錄.....	II
第一章 簡介	
1-1 前言 (含研究動機).....	1
1-2 研究計畫摘要.....	2
1-3 文獻探討.....	4
1-4 研究方法.....	6
第二章 蛋白質表現與純化.....18	
第三章 酵素基本性質分析.....21	
第四章 突變株各項特性分析.....24	
第五章 抑制劑分析與篩選	
5-1 受質類似物的水解與結合分析.....	28
5-2 結構模擬與 docking 分析.....	39
第六章 結論.....47	
參考文獻.....51	

圖&表目錄

圖 2-1	沙門氏菌與斑馬魚之尿囊素水解酵素序列比對.....	18
圖 2-2	尿囊素水解酵素之 SDS-PAGE.....	19
圖 2-3	突變株尿囊素水解酵素之 SDS-PAGE.....	20
圖 2-3	突變株尿囊素水解酵素之 SDS-PAGE.....	20
圖 3-1	各種含有金屬輔因子之尿囊素水解酵素活性.....	21
圖 3-2	尿囊素水解酵素之突變株活性.....	21
圖 3-3	不含金屬輔因子之尿囊素水解酵素外加金屬離子之活性表現....	22
圖 3-4	尿囊素水解酵素之酸鹼催化適性研究.....	22
圖 3-5	尿囊素水解酵素之抑制劑 AHA 對酵素活性影響.....	23
圖 4-1	尿囊素水解酵素之定點突變位結構圖.....	24
表 4-1	尿囊素水解酵素之突變株活性比較.....	25
圖 4-2A	KCX146 突變株(含 Co^{2+})的活性之化學法回復.....	25
圖 4-2B	KCX146 突變株(含 Mn^{2+})的活性之化學法回復.....	25
圖 4-3	KCX146 與相關金屬鍵結的胺基酸、短鏈羧酸之結構圖.....	26
圖 4-4A	Carbamate 作用形式.....	26
圖 4-4B	Carboxylate 作用形式.....	26
圖 4-4C	Thiolate 作用形式.....	26
圖 4-5	相關酵素活性之重要胺基酸位的演化高度保留分析.....	27
圖 5-1	不同環狀或官能基的受質類似物之化學結構圖.....	28

圖 5-2A	<i>St</i> ALLase 試劑與受質類似物對尿囊素水解酵素之螢光淬滅的效果.....	28
圖 5-2B	<i>St</i> ALLase K146A 試劑與受質類似物對尿囊素水解酵素之螢光淬滅的效果.....	29
圖 5-2C	<i>St</i> ALLase S317A 試劑與受質類似物對尿囊素水解酵素之螢光淬滅的效果.....	30
圖 5-2D	<i>St</i> ALLase N94A/S317A 試劑與受質類似物對尿囊素水解酵素之螢光淬滅的效果.....	31
圖 5-2E	<i>St</i> ALLase 試劑與受質類似物對尿囊素水解酵素之螢光數值變化作圖分析.....	32
圖 5-2F	<i>St</i> ALLase K146A 試劑與受質類似物對尿囊素水解酵素之螢光數值變化作圖分析.....	33
圖 5-2G	<i>St</i> ALLase S317A 試劑與受質類似物對尿囊素水解酵素之螢光數值變化作圖分析.....	34
圖 5-2H	<i>St</i> ALLase N94A/S317A 試劑與受質類似物對尿囊素水解酵素之螢光數值變化作圖分析.....	35
表 5-1	<i>St</i> ALLase 與試劑、受質類似物之 K_d 值.....	37
表 5-2	<i>St</i> ALLase K146A 與試劑、受質類似物之 K_d 值.....	37
表 5-3	<i>St</i> ALLase S317A 與試劑、受質類似物之 K_d 值.....	37
表 5-4	<i>St</i> ALLase N94A/S317A 與試劑、受質類似物之 K_d 值.....	38

圖 5-3A	ALLase & 2,6-pyridinedicarboxylic acid 結合位置預測.....	39
圖 5-3B	ALLase & acetohydroxamic acid 結合位置預測.....	39
圖 5-3C	ALLase & hydantoin 結合位置預測.....	39
圖 5-3D	ALLase & dihydrouracil 結合位置預測.....	40
圖 5-3E	ALLase & L-dihydroorotic acid 結合位置預測.....	40
表 5-5	蛋白質與藥物小分子結合位置預測之 score.....	40
圖 5-4A	預測 allantoin 之 solution1:藥物小分子與胺基酸鍵結位.....	41
圖 5-4B	預測 allantoin 之 solution5:藥物小分子與胺基酸鍵結位.....	41
圖 5-4C	預測 2,6-pyridinedicarboxylic acid 之 solution1 : 藥物小分子與胺 基酸鍵結位.....	41
圖 5-4D	預測 2,6-pyridinedicarboxylic acid 之 solution3 : 藥物小分子與胺 基酸鍵結位.....	41
圖 5-4E	預測 acetohydroxamic acid 之 solution1 : 藥物小分子與胺基酸鍵 結位.....	41
圖 5-4F	預測 acetohydroxamic acid 之 solution5 : 藥物小分子與胺基酸鍵 結位.....	42
圖 5-4G	預測 hydantoin 之 solution1:藥物小分子與胺基酸鍵結位.....	42
圖 5-4H	預測 hydantoin 之 solution6:藥物小分子與胺基酸鍵結位.....	42
圖 5-4I	預測 dihydrouracil 之 solution1:藥物小分子與胺基酸鍵結位.....	42
圖 5-4J	預測 dihydrouracil 之 solution4:藥物小分子與胺基酸鍵結位.....	42

圖 5-4K	預測 L-dihydroorotic acid 之 solution1:藥物小分子與胺基酸鍵結位.....	43
圖 5-4L	預測 L-dihydroorotic acid 之 solution4:藥物小分子與胺基酸鍵結位.....	43
表 5-6	預測藥物小分子與胺基酸鍵結位.....	43
圖 5-5A	尿囊素水解酵素之 allantoin & hydantoin 結合位疊圖比較.....	44
圖 5-5B	尿囊素水解酵素之 allantoin & acetohydroxamic acid 結合位疊圖比較.....	44
圖 5-5C	尿囊素水解酵素之 allantoin & L-dihydroorotic acid 結合位疊圖比較.....	45
圖 5-5D	尿囊素水解酵素之 allantoin & dihydrouracil 結合位疊圖比較.....	45
圖 5-5E	尿囊素水解酵素之 allantoin & 2,6-pyridinedicarboxylic acid 結合位疊圖比較.....	46
圖 6-1	嘌呤代謝路徑.....	49
圖 6-2	人類尿酸代謝路徑.....	50

第一章 簡介

1-1 前言 (含研究動機)

一般來說金屬蛋白質在所有生物的基因產物中大約佔1/3左右，在許多基因體序列皆已解碼的今天，金屬體¹ (metalloomics) 的研究亦開始受到注目。其中在 Amidohydrolase 超級酵素家族中，所有已知的反應幾乎都與金屬輔因子有密切關係，這些酵素都需要金屬來執行其水解反應；然不同的是它們內含的金屬離子數量不同、種類不同，有些又需啟動尚不清楚的轉譯後修飾，將帶有正電的lysine羧化 (carboxylation) 以便轉為負電來鍵結金屬，但令人好奇的是此家族中此lysine後修飾的羧化並非完全保留，更增加了研究的興趣。

先前的研究發現部分尿囊素水解酵素為含鐵酵素，但尿囊素水解酵素又分為金屬依賴 (metal-dependent) 與金屬非依賴 (metal-independent) 兩種類型，其中金屬依賴又可分為具單核與雙核中心這兩種類型。這些類型胺基酸序列相似程度極低，更增加了反應機制研究的興趣：不同的活性區 (包含結合不同種類與數量的金屬) 環境可產生相似且合理速度的催化反應？因此，若能對不同來源的尿囊素水解酵素其金屬結合與轉譯後修飾的性質進行探討，除可合理推測這些酵素如何藉由輔因子與特殊的羧化修飾進行反應，也許亦可對酵素如何利用趨同演化來達到一樣的生理反應提供想法。

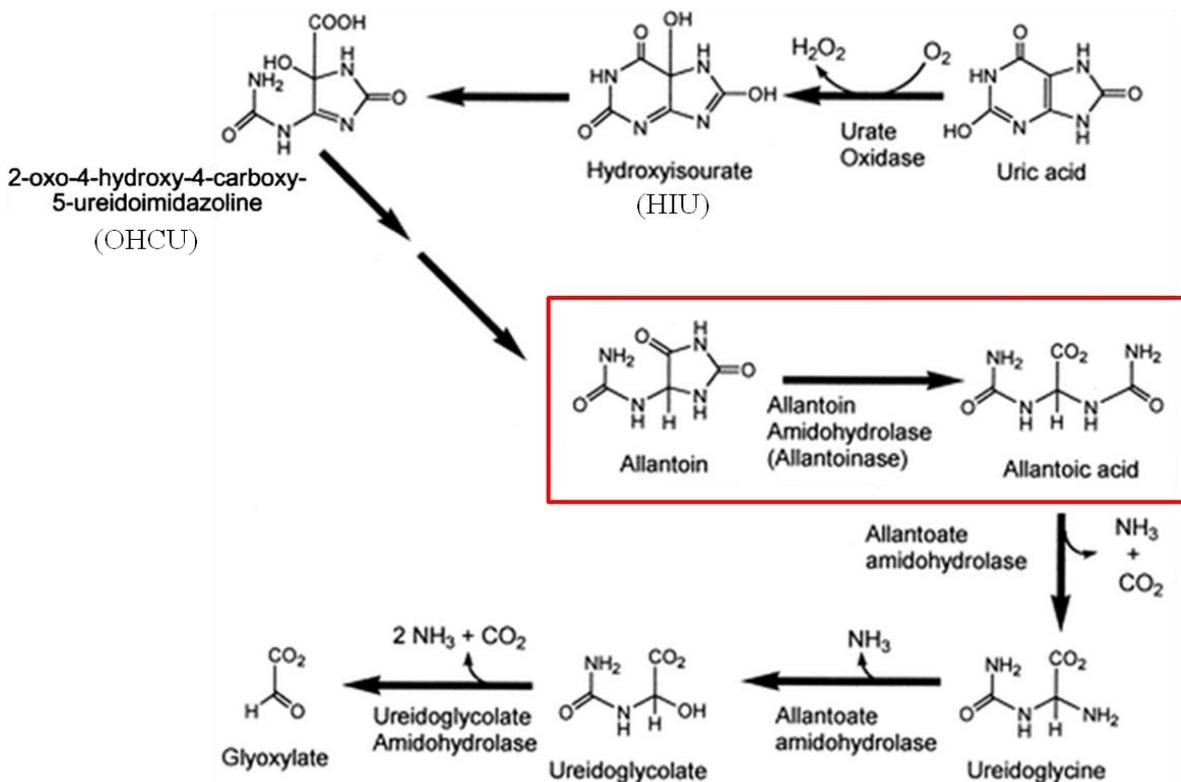
1-2 研究計畫摘要

尿囊素水解酵素 (allantoinase) 催化 allantoin 水解成 allantoic acid，為固氮作用中關鍵的反應之一。有很多，但不是全部的尿囊素水解酵素，含有一個特別的後修飾的羧基化 lysine，用於在活性區中雙金屬的鍵結。這透露出一個重要的問題：這個後修飾的羧基化 lysine 是否真的必需於金屬之鍵結；尤其在這個家族中，高等生物與細菌來源的酵素其序列、四級結構、金屬含量與催化特性都很不一樣。在金屬依賴類型的尿囊素水解酵素家族中，其活性中心帶有兩個鐵離子，且此螯合主要是由正電胺基酸 lysine 經由羧化轉譯後修飾 (posttranslational carboxylation) 而成為負電，此在原核生物中極為罕見。在此計劃，針對特別的後修飾的羧基化 lysine 研究，發現原不具活性的 K146A，藉著外加各種長度的羧酸 (acetic acid、propionic、acidbutyric acid) 來模擬此後修飾，而證實活性可由化學回復 (圖4-2A, 圖4-2B, 圖4-3)，ConSurf Server 的分析結果證明此 Lys 在ALLase 家族中極為高度的保留 (圖4-5)。使用試劑、受質類似物等化學物質來探測尿囊素水解酵素的螢光淬滅效果 (圖5-2A至D) 而推斷結合能力 (圖5-2E至H,表5-1至4)，並藉由生物資訊分析來搭配 PyMOL 程式來繪圖亦得知試劑與受質類似物與 ALLase 結合之可能位置 (圖5-3A至E)，藉此也探討這些化學物質與尿囊素水解酵素之哪些胺基酸作鍵結 (圖5-4A至L)，並比較與尿囊素 (allantoin) 結合位置與方向的差異(圖5-5A至E、表5-6)。我們欲研究不同來源的尿囊素水解酵素：原核生物的沙門氏菌與真核生物的斑馬魚的尿囊素水解酵素其生化特性的比較。經演化高度保留性質之序列比較分析，沙門氏菌與真核生物的斑馬魚的尿囊素水解酵素擁有相似的重要胺基酸位置之高度保留特性，但質純的斑馬魚之尿囊素水解酵素經外加金屬輔因子作質譜儀測定，然卻未明顯的水解酵素活性變化，因此研究轉向對轉譯後修飾的關連性進行更深入的探討，以及

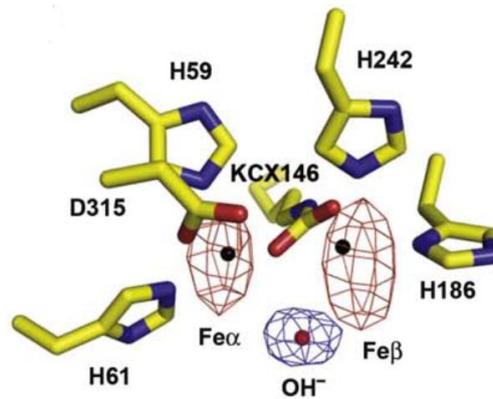
部分內容改向探討尿囊素水解酵素的抑制與相關藥物，藉著試劑與受質類似物來探其受質特異性與在嘌呤代謝路徑中所扮演的角色。由於此酵素從動物與細菌來源可能彼此有著很大的差異，尤其人類並不具有此酵素，因此細菌的尿囊素水解酵素也許亦可以做為標靶以研發新型抗生素。

1-3 文獻探討

尿囊素水解酵素廣泛存在於細菌、真菌與植物中，以及少部分的動物中，催化allantoin 水解成 allantoinic acid，為固氮作用中關鍵的反應之一⁴。目前共有兩種尿囊素水解酵素已被發現，主要分為金屬依賴與金屬非依賴兩種類型，且其蛋白質之胺基酸序列大不相同，顯示在生物的演化過程中，為了得到所需的生理活性，此酵素有可能趨同演化⁵。



在金屬依賴類型的尿囊素水解酵素家族中，其活性中心帶有兩個金屬離子，可能是鐵離子；但特別引人注意的是，兩個金屬離子的整合主要是由正電胺基酸 lysine 經由羧化轉譯後修飾 (posttranslational carboxylation) 而成為負電以便鍵結活性中心的雙金屬並形成配位，此情況相當少見於生物界中⁶。



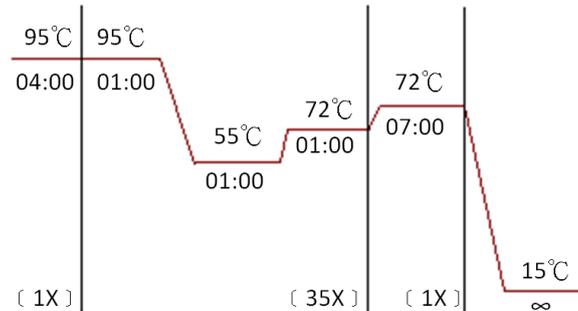
真核生物與原核生物的尿囊素水解酵素亦有很大的差異。例如，細菌的尿囊素水解酵素為四套體，然其從魚與兩棲類的來源分別為單套體與雙套體⁷。另外，基因的數量也有差異，例如豆科植物具有兩個以上不同長度的尿囊素水解酵素的基因⁸；昆蟲雖只有一個尿囊素水解酵素的基因，但必須經過轉譯後切除程序 (post-translationally cleaving)，方能得到經調控後具有活性的酵素⁹。因此，這些不同生物的尿囊素水解酵素的生化特性，是否能引導我們開發出以細菌尿囊素水解酵素為標靶的新型抗生素亦值得研究。然而截至目前為止，還未有任何的論文描述真核生物尿囊素水解酵素的基因轉殖，使得比較原核與真核生物的尿囊素水解酵素受到很大的限制。

1-4 研究方法

1.1 沙門氏菌之 Allantoinase 蛋白質取得

1.1.1 聚合酶連鎖反應

聚合酶連鎖反應所使用之儀器為 Bio-Rad Thermocycler。實驗進行反應條件如下：



實驗使用材料條件如下：

- (1) 84 μ l的ddH₂O
- (2) 10 μ l的10X PCR buffer
- (3) 2 μ l的10mM三磷酸去氧核糖核苷酸 (dNTPs)
- (4) 1 μ l的10 μ M 5'端引子與1 μ l的10 μ M 3'端引子
- (5) 1 μ l的沙門氏菌原菌菌液當模板 (Template)
- (6) 1 μ l的*Thermus aquaticus*聚核酶酵素 (*Taq* polymerase)

取4 μ l內容產物與1 μ l的6X loading dye混合均勻後，注入到1%瓊脂膠 (0.5X TAE buffer and 1% agarose)內進行電泳 (electrophoresis)，於0.5X TAE buffer，電流100 V跑膠30分鐘，EtBr染色10~20分鐘後用紫外光照膠確認內容產物是否正確。接著以PCR clean up kit進行產物的純化，其步驟如下：

- (1) 將PCR產物與5倍體積的Buffer PX混合均勻
- (2) 將混合好的反應物加入進column，以13000 rpm 離心1分鐘
- (3) 加入500 μ l的Buffer WF，以13000 rpm 離心1分鐘

- (4) 加入500 μ l的Buffer WS，以13000 rpm 離心1分鐘
- (5) 之後再以13000 rpm 離心3分鐘 (將WS buffer內的ethanol分離乾淨)
- (6) 最後加入50 μ l的elution buffer以以13000 rpm 離心2分鐘，完成 PCR clean up

1.2 表現質體 pET21b-StALLase 之製備

實驗步驟如下：

- (1) 將PCR純化後之產物以及質體抽取後之產物以限制酶*EcoRI*和*HindIII*進行剪切，反應條件為4 μ l的酵素、6 μ l的10X *EcoRI* buffer、42 μ l的產物，混合均勻後置於37 °C培養箱中反應16小時。
- (2) 將剪切完成的基因片段依PCR clean up步驟操作，除去剪切下來的多於小片段，以免妨礙接合作用。
- (3) 將剪切完成的質體依gel extractin步驟操作，除去剪切下來的多於小片段，以免妨礙接合作用。gel extractin實驗步驟如下：
 - a. 將質體和6X loading dye混合均勻，注入到1%瓊脂膠內進行電泳，於0.5X TAE buffer，電流100 V跑膠30分鐘，EtBr染色10~20分鐘後用紫外光照膠確認內容產物大小。
 - b. 將正確大小之質體片段連同膠體一起切下，置於eppendorf中秤重，如果膠體重量為0.2g，則加入200 μ l的capture buffer type 3，以此類推。
 - c. 之後加熱60 °C，10分鐘，將eppendorf內之膠體完全溶解。
 - d. 將eppendorf內之液體取出加入GFX column中，置於室溫反應1分鐘後，再以13000 rpm 離心1分鐘。
 - e. 於column內加入500 μ l的Wash buffer type 1，以13000 rpm 離心30秒。
 - f. 再以13000 rpm 離心1分鐘 (將Wash buffer中的ethanol分離乾淨)。

- g. 最後加入50 μ l的elution buffer以以13000 rpm 離心2分鐘，完成gel extractin。
- (4) 將純化過的基因產物及質體混合，以亮度3:1的比例進行接合作用。反應條件為0.5 μ l的T4 DNA ligase 和3.5 μ l的10X ligase buffer，以總體積4 μ l在4°C冰箱中反應16小時。

1.3 質體轉型作用

實驗步驟如下：

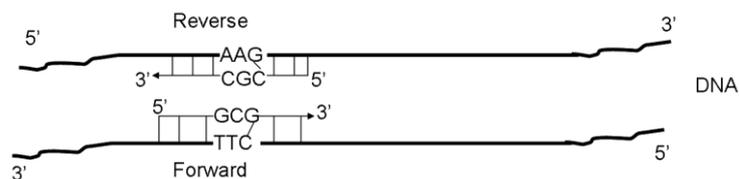
- (1) 取100 μ l之經過特殊處理的大腸桿菌勝任細胞 (*ECOS*TM101) 和上述已經處理好的clone反應物5 μ l混合均勻。
- (2) 之後置於42 °C反應45秒進行熱衝擊 (heat shock)，使質體易於被大腸桿菌吸收進入體內。
- (3) 隨即置於冰上1分鐘，而後將菌液均勻塗抹在LB培養盤，放置於37 °C培養箱，直到長出菌落。
- (4) 之後進行質體抽取動作，以限制酶*EcoRI*和*HindIII*將產物處理後，置於37 °C 培養箱，反應時間2小時。質體抽取實驗步驟如下：
- 將含有pET21b質體之單一菌落取下，加入含4 μ l 100 mg/ml ampicillin的4 ml LB培養液中，置於37 °C培養箱，震盪培養約16小時至OD1.3。
 - 之後將菌液以12000 rpm 離心1分鐘，去除上清液。
 - 加入250 μ l的Solution I將離心下來的菌塊溶散，並置在冰上2分鐘。
 - 加入250 μ l的Solution II，用手緩慢搖晃均勻，並置於室溫1分鐘。
 - 加入250 μ l的Solution III，慢慢混合均勻，置室溫反應1分鐘。
 - 以11000 rcf 離心10分鐘，然後將上清液取出（避免打散底部白色菌塊）。
 - 取出的上清液放進column中靜置3分鐘，再以6300 rcf 離心1分鐘。

- h. 將column下方之離心液體除去，再加入500 μ l Wash solution至column中，以7200 rcf 離心1分鐘（此步驟兩次）。
 - i. 以8800 rcf 空轉離心2分鐘（將Wash solution中的ethanol分離乾淨）。
 - j. 最後加入50 μ l的elution buffer，置在37 $^{\circ}$ C培養箱反應10分鐘，再以8800 rcf 離心2分鐘，完成質體抽取。
- (5) 取4 μ l內容產物與1 μ l的6X loading dye混合均勻，注入到1%瓊脂膠內進行電泳，於0.5X TAE buffer，電流100 V跑膠30分鐘，EtBr染色10~20分鐘後用紫外光照膠確認內容產物是否正確。若clone成功則可看見質體與StALLase的兩種不同大小片段。
- (6) 經定序確認結果無誤，至此完成StALLase clone的製備。

1.4 定點突變 (Site directed mutagenesis)

實驗步驟如下：

- (1) 設計primers，一段沙門氏菌的尿囊素水解酵素質體基因序列，包含要突變的基因序列(27bp)，直接找出要突變的胺基酸序列位，將原先的胺基酸密碼子置換成另一胺基酸密碼子，寫下forward and reverse的引子，突變要在引子的中間位。

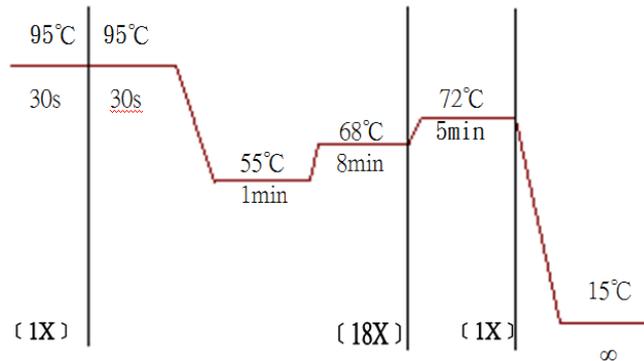


- (2) PCR實驗使用材料條件如下：

- a. 40 μ l的ddH₂O
- b. 5 μ l的10X Pfu buffer
- c. 1 μ l的10mM三磷酸去氧核糖核苷酸 (dNTPs)
- d. 1 μ l的10 μ M 5'端引子與1 μ l的10 μ M 3'端引子
- e. 1 μ l的StALLase-pET21b之質體模板 (Template)

f. 1 μ l的*turbo* polymerase

(3) 實驗進行反應步驟如下：



- (4) 取5 μ l內容產物與1 μ l的6X loading dye混合均勻後，注入到1%瓊脂膠 (0.5X TAE buffer and 1% agarose)內進行電泳 (electrophoresis)，於0.5X TAE buffer，電流100 V跑膠30分鐘，EtBr染色10~20分鐘後用紫外光照膠確認內容產物大小是否正確。
- (5) 使用限制酶 DpnI切除帶甲基的模板，此反應置於37 °C培養箱約14小時，再經1%瓊脂膠電泳確認產物。
- (6) 之後進行質體轉型作用，並抽取其質體產物，取產物4 μ l，以限制酶 *EcoRI*和*HindIII*將產物做Check處理後，置於37 °C培養箱，反應時間2小時，。
- (7) 取10 μ l內容產物與2 μ l的6X loading dye混合均勻後，注入到1%瓊脂膠 (0.5X TAE buffer and 1% agarose)內進行電泳 (electrophoresis)，於0.5X TAE buffer，電流100 V跑膠30分鐘，EtBr染色10~20分鐘後用紫外光照膠確認內容產物大小是否正確。若clone成功則可看見質體與*StALLase*的兩種不同大小片段。
- (8) 經定序確認結果無誤，至此完成*StALLase* 之site directed mutagenesis clone的製備。

1.5 蛋白質表現與純化

實驗步驟如下：

- (1) 將上述轉型之plate用挑菌棒取出單一菌落，加入含4 μ l 100 mg/ml ampicillin的4 ml LB培養液中，置於37 °C培養箱，震盪培養約16小時至OD1.3，以12000 rpm 離心1分鐘收集在eppendorf，再用400 μ l LB培養液和150 μ l 50% glycerol回融製成stock (保存在-80°C冰箱)。
- (2) 從stock中取出10 μ l，加入含4 μ l 100 mg/ml ampicillin的4 ml μ l LB培養液中，置於37 °C培養箱，震盪培養約4小時至OD1.3，再加進含150 μ l 100 mg/ml ampicillin的500 ml LB培養液中，置於37 °C培養箱，震盪培養約5小時後，加入125 μ l 1M IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)，並繼續培養約8小時。
- (3) 之後以高速離心機 (Beckman)14000 rpm於4 °C低溫離心20分鐘。
- (4) 除去上清液，以5 mM imidazole將底部菌塊回融。
- (5) 以超音波破碎機 (sonicator) 將溶於5 mM imidazole內的菌體打碎。
- (6) 以12000 rpm於4 °C低溫離心20分鐘，收集上清液。
- (7) 以親和性管柱 (column HisTrapTMHP) 方式做純化。
- (8) 純化出的蛋白質以跑SDS-PAGE進行確認，約55KDa。

1.6 蛋白質透析

實驗使用之透析膜為Thermo Snake Skin[®] Pleated Dialysis Tubing。操作步驟如下：

- (1) 剪下適當長度後，將透析膜浸濕於ddH₂O，2分鐘。
- (2) 要確定蛋白質是否適用於置換之buffer，避免產生沈澱。
- (3) 將透析膜浸濕於要置換之buffer (此實驗使用之buffer為20 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7.0)，2分鐘。
- (4) 將透析膜延展拉平，並先用長型夾子夾住下端，放入欲置換buffer之
- (5) 蛋白質，將上端用長型夾子夾住，並預留約1公分之置換膨脹空間。

- (6) 根據置換蛋白質之體積不同，使用不同的置換buffer之體積，如20 ml之蛋白質則須置於1000 ml之buffer。
- (7) 將蛋白質懸掛於欲置換之buffer中，並藉磁石攪動buffer，轉速約500 rpm，並置於4 °C環境下作用4小時，即完成蛋白質透析。

2.1 利用紫外光-可見光光譜儀分析尿囊素水解酵素之酵素活性

本篇研究所使用的紫外光-可見光光譜儀是 Thermo 的 Helios Omega UV-Visible Spectrophotometer，總反應體積為 2000 μ l，實驗條件如下：

(1) 偵測 ALLase 在 pH 不同環境下之酵素活性：

- a. 反應環境之緩衝液：1M Tris-HEPES，調配成pH 6、pH 6.5、pH 7、pH 7.5、pH 8、pH 8.5、pH 9
- b. ALLase濃度：2.8478 mg/ml
- c. 受質：尿囊素 (allantoin)
- d. 偵測時間：2分鐘
- e. 反應環境溫度：25 °C
- f. 偵測波長：258 nm

(2) 偵測ALLase在不同金屬輔因子培養下之酵素活性：

- a. 反應環境之緩衝液：2M Tris pH8.01, 20mM Tris pH8.98
- b. ALLase濃度：2.8478 mg/ml
- c. 受質：尿囊素 (allantoin)
- d. 偵測時間：2分鐘
- e. 反應環境溫度：25 °C
- f. 偵測波長：258 nm

(3) 偵測ALLase (WT)外加 CoCl₂ 之酵素活性

- a. 反應環境之緩衝液：2M Tris pH8.01, 20mM Tris pH8.98
- b. ALLase濃度：2.8478 mg/ml
- c. 受質：尿囊素 (allantoin)

- d. 延遲時間：11分鐘
 - e. 偵測時間：2分鐘
 - f. 反應環境溫度：25 °C
 - g. 偵測波長：258 nm
- (4) 偵測培養在 Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} 的 ALLase 個別與 2,6-Pyridinedicarboxylic acid、8-Hydroxyquinoline-5-sulfonic acid 在不同 pH 值反應
- a. 反應環境之緩衝液：1M Tris-HEPES，調配成 pH 6、pH 6.5、pH 7、pH 7.5、pH 8、pH 8.5、pH 9, 20mM Tris pH8.98
 - b. ALLase 濃度：2.8478 mg/ml
 - c. 受質：尿囊素 (allantoin)
 - d. 偵測時間：2分鐘
 - e. 反應環境溫度：25 °C
 - f. 偵測波長：258 nm
- (5) 偵測培養在 Co^{2+} , Mn^{2+} 的 ALLase 與 acetohydroxamic acid (inhibitor)
- a. 反應環境之緩衝液：2M Tris pH8.01, 20mM Tris pH8.98
 - b. ALLase 濃度：2.8478 mg/ml
 - c. 受質：尿囊素 (allantoin)
 - d. 偵測時間：2分鐘
 - e. 反應環境溫度：25 °C
 - f. 偵測波長：258 nm
- (6) 偵測培養在 Co^{2+} 的不同突變株 ALLase 之酵素活性：
- a. 反應環境之緩衝液：2M Tris pH8.01, 20mM Tris pH8.98
 - b. ALLase 濃度：2.8478 mg/ml
 - c. 受質：尿囊素 (allantoin)
 - d. 偵測時間：2分鐘
 - e. 反應環境溫度：25 °C

f. 偵測波長：258 nm

(7) 偵測APO-ALLase外加不同金屬輔因子之酵素活性：

a. 反應環境之緩衝液：2M Tris pH8.01, 20mM Tris pH8.98

b. ALLase濃度：2.8478 mg/ml

c. 受質：尿囊素 (allantoin)

d. 偵測時間：2分鐘

e. 反應環境溫度：25 °C

f. 偵測波長：258 nm

(8) 偵測培養在Co²⁺的ALLase K146A與三種短鏈羧酸之酵素活性：

a. 反應環境之緩衝液：2M Tris pH8.01, 20mM Tris pH8.98

b. ALLase濃度：2.8478 mg/ml

c. 受質：尿囊素 (allantoin)

d. 三種短鏈羧酸：Acetic acid、Propionic acid、Butyric acid

e. 偵測時間：2分鐘

f. 反應環境溫度：25 °C

g. 偵測波長：258 nm

2.2 利用螢光光譜儀分析尿囊素水解酵素之蛋白質-小分子交互作用

本篇研究所使用的螢光光譜儀型號為 Hitachi F-2700，總反應體積為 2000 μ l，實驗條件如下：

(1) 用螢光淬滅現象偵測ALLase與不同受質類似物之作用情況

a. 反應環境之緩衝液：20 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7.0

b. ALLase濃度：7.4372 mg/ml

c. 受質類似物滴定濃度：0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 mM

d. 偵測間隔時間：依不同受質類似物而不同

e. 反應環境溫度：25 °C

f. 偵測波長 (ex/em)：278/330 nm

(2) 用螢光淬滅現象偵測ALLase與抑制劑之作用情況

- a. 反應環境之緩衝液：20 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7.0
- b. ALLase濃度：7.4372 mg/ml
- c. 抑制劑滴定濃度：0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 mM
- d. 偵測間隔時間：依不同抑制劑而不同
- e. 反應環境溫度：25 °C
- f. 偵測波長 (ex/em)：278/330 nm

3.1 蛋白質結構預測

(1) 進入 SWISS-MODEL 網站 <http://swissmodel.expasy.org/>，點進左側的 Automated Mode 這個選項，在 Automated Mode 頁面填入如下：

- a. E-mail
- b. Protein title
- c. 要預測的蛋白質之胺基酸序列
- d. PDB-ID (可不設，會自動尋)
- e. Chain (可不設，會自動尋)
- f. 按submit，等預測結果，到信箱收信按結果連結

(2) 進入 PDB 網站 <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>，找相似結構與功能的蛋白質 (PDB code)。

3.2 藥物小分子與蛋白質結構結合預測

(1) 藥物小分子於Drug Bank 網站<http://www.drugbank.ca/>，下載所需小分子3D Structure (pdb檔)。

(2) 進入 PATCHDOCK 網站 <http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>，此頁面填入如下：

- a. Receptor Molecule 右列的upload file 上傳將結構預測的蛋白質檔 (pdb檔)
- b. Ligand Molecule 右列的 upload file 上傳藥物小分子檔 (pdb 檔)
- c. E-mail
- d. Clustering RMSD設為 4

- e. Complex Type 設為 Enzyme-inhibitor
- f. 按submit，等預測結果，到信箱收信按結果連結

3.3 PyMol使用

3.3.1 藥物小分子與蛋白質結構結合

- (1) 以PyMol打開PATCHDOCK預測的藥物分子與蛋白質結合的結構pdb檔。
- (2) 選擇藥物分子，在右方的物件部分選擇 A (Action) → rename object，重新命名。
- (3) 小分子：S (Show) → stick；protein：S (Show) → cartoon
- (4) 要變色區的序列反白，在 C (Color)，自訂顏色。
- (5) 算氫鍵距離，步驟如下：
 - a. 點蛋白質可能交互作用的胺基酸圖出現紅點→用sele的S →stick(胺基酸支鏈出現)
 - b. 按上方列選擇 Mouse → 3 Button Editing Mode (開啟此模式)
 - c. 用左鍵點胺基酸支鏈分子 → 出現銀色圈圈，輸入指令 " dist "，出現距離數(單位Å)
 - i. shift + 滑鼠中鍵→可移動數字
 - ii. 更改數字大小，輸入指令 " set label_size=12 "(字大小範圍:12~20)
 - iii. 更改size chain粗細，輸入指令 " set line_width=5 "
 - d. 找完距離後，按上方列選擇Mouse → 3 Button Viewing Mode (關閉此模式)
 - e. 設範圍自動尋一定距離內的胺基酸(自動出現紅點)，輸入指令 " select 分子名 around 5 "(1~5Å可)(可知道哪幾個a.a.與小分子的距離在5以內)
 - f. 在右方的物件部分選擇 L (Label) → residues，標出胺基酸名稱
 - g. 顯示所有與小分子有關的氫鍵，小分子的A(Action) → find → Polar contacts → to any atoms
- (6) 存圖檔，按 " Ray "，將檔案結構美化，輸入指令 " png ALLase 與小分子名 "，將結構檔案輸出為png圖片檔，檔名為ALLase與小

分子名。

(7) 整個檔另存新檔 File → Save session As。

3.3.2 結合不同受質類似物之蛋白質疊圖

(1) 以PyMol打開ALLase結合allantoin (PATCHDOCK預測原檔) 的蛋白質結構pdb檔。

(2) 在右方的物件部分選擇H (Hide) → everthing，將所有隱藏。

(3) 在右方的物件部分選擇S (Show) → cartoon，畫出緞帶卡通圖之蛋白質。

(4) 在右方的物件部分選擇S (Show) → sticks，畫出棒狀小分子。

(5) 接著在上方的指令列輸入指令 " load docking1.pdb " (PATCHDOCK預測原檔)，按Enter將結果載入。

(6) 在右方的物件部分選擇C (Color)，自訂顏色。

(7) 輸入指令 " bg_color white "，將背景設為白色。

(8) 按下指令 " Ray "，將檔案結構美化。

(9) 輸入指令 " png 小分子名與小分子名 "，將結構檔案輸出為png圖片檔，檔名為小分子名與小分子名。

(10) 整個檔另存新檔 File → Save session As。

第二章 蛋白質表現與純化

在基因體資料庫中找出沙門氏菌可能的尿囊素水解酵素基因，接著設計合適的寡核苷酸引子 (oligonucleotide primer) 並加上限制酶切點，利用聚合酶鏈鎖反應 (polymerase-chain reaction, PCR) 放大尿囊素水解酵素基因，並接在 pET21 表現載體上，並經基因定序確認無誤。

ConSurf Results



圖2-1：運用ConSurf Server分析沙門氏菌（下列）與斑馬魚（上列）之尿囊素水解酵素序列比對，分析結果指出斑馬魚之H59、H61、N94、K146、H186、H242、D315、S317（用黃色圓表示）等重要胺基酸位置與沙門氏菌之尿囊素水解酵素相同，且為演化上高度保留的重要位置。

突變分析是使用定點突變 (Site-directed mutagenesis) 方式，設計含有突變合適的寡核苷酸引子，運用聚合酶鏈鎖反應將Wild-type型尿囊素水解酵素基因質體之原先的胺基酸密碼子置換成另一胺基酸密碼子，並經基因定序確認無誤。

尿囊素水解酵素大量表現於沙門氏菌並已利用親和性管柱層析法得到質純的蛋白質，如圖SDS-PAGE所示。

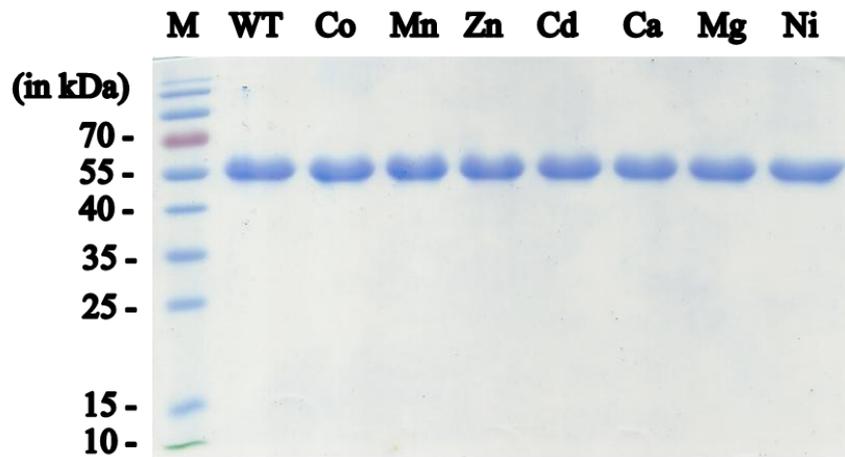


圖2-2：M, marker; Lane1, St ALLase之wild-type; Lane 2, St ALLase之Co (CoCl₂ 5mM); Lane 3, St ALLase之Mn (MnCl₂ 5mM); Lane 4, St ALLase之Zn (ZnCl₂ 1mM); Lane 5, St ALLase之Cd (CdCl₂ 1mM); Lane 6, St ALLase之Ca (CaCl₂ 5mM); Lane 7, St ALLase之Mg (MgCl₂ 5mM) ; Lane 8, St ALLase之Ni (NiCl₂ 5mM)

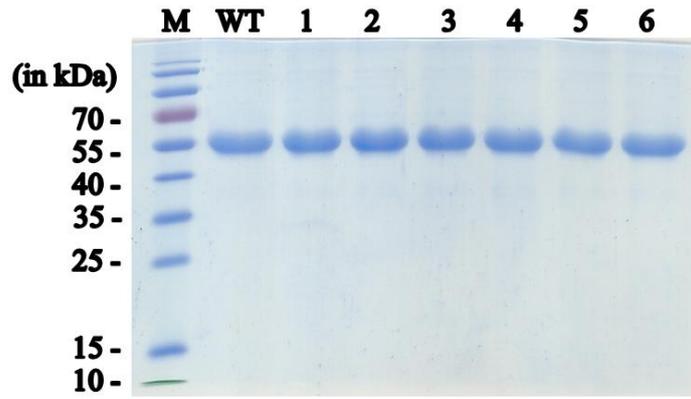


圖2-3：M, marker；WT, wild-type；Lane 1, *St* ALLase H59A；Lane 2, *St* ALLase H61A；Lane 3, *St* ALLase H186A；Lane 4, *St* ALLase N94A；Lane 5, *St* ALLase S317A；Lane 6, *St* ALLase N94A/ S317A。Lane 1 - 6添加5mM CoCl_2 於細菌培養液中所純化。

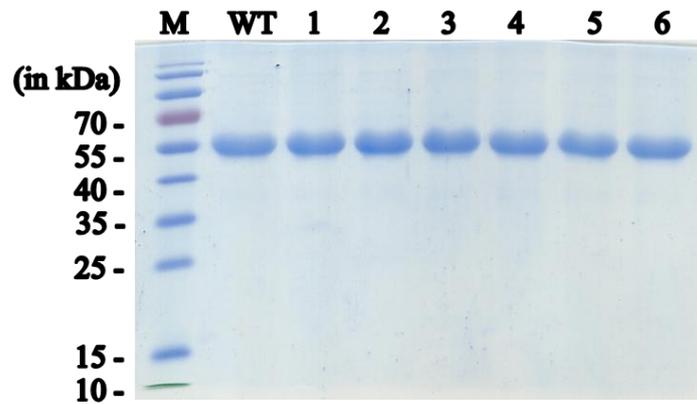


圖2-4：M, marker；WT, wild-type；Lane 1, *St* ALLase K146C；Lane 2, *St* ALLase K146D；Lane 3, *St* ALLase K146E；Lane 4, *St* ALLase K146H；Lane 5, *St* ALLase D315A；Lane 6, *St* ALLase D315E。Lane 1 - 6添加5mM CoCl_2 於細菌培養液中所純化。

第三章 酵素基本性質分析

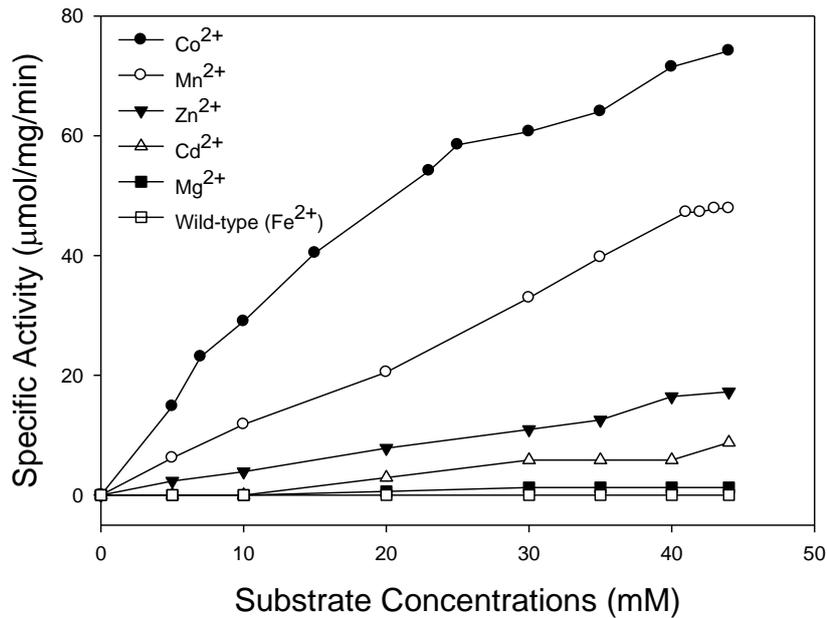


圖3-1：Activity of metal-amended ALLase. 金屬輔因子加在細菌培養液時，對其活性影響順序為 $\text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+} \gg \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} \geq \text{Ni}^{2+}$ ，因此選擇了前三者活性較為明顯的 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 輔因子來用於酵素活性研究探討。

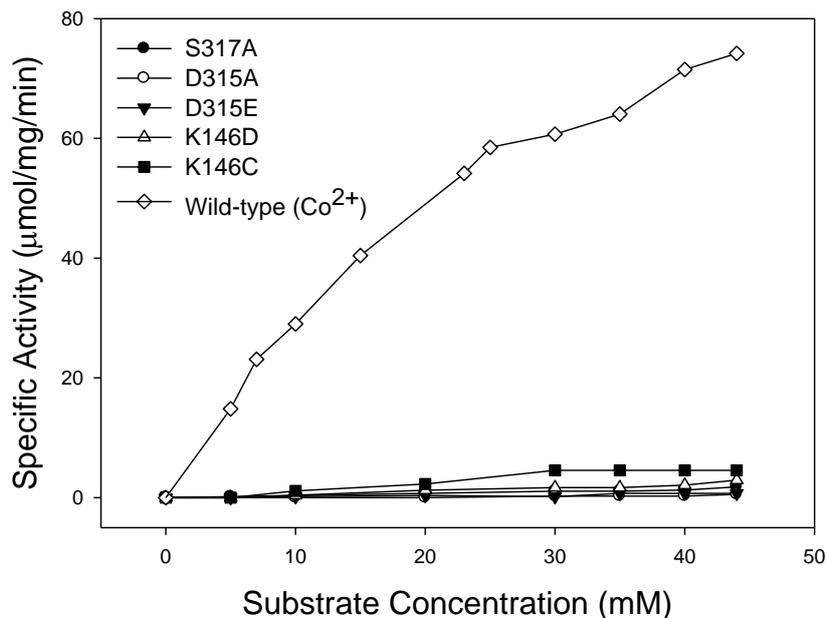


圖3-2：Mutational analysis of Co^{2+} -amended ALLase metal binding sites. 突變後活性亦大幅喪失，值得注意的是，K146C仍有相當的活性，K146需帶負電與金屬輔因子交互作用來牽動酵素活性，另外，D315E是有與金屬輔因子做電子推拉，而保有微弱活性；S317與N94在支配酵素活性有重要地位，經由點突變成A更可確信。

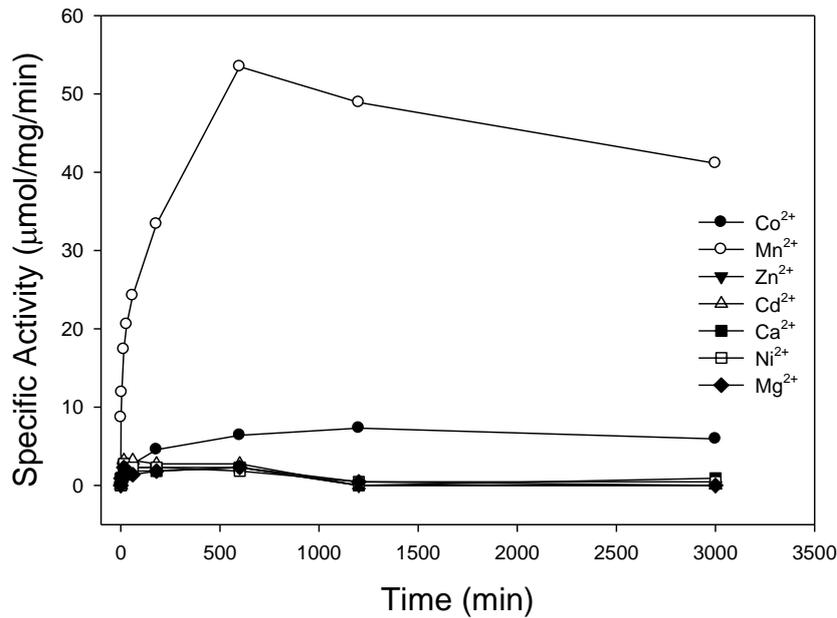


圖3-3：Effect of added metal ions on apo-ALLase. 在細菌培養液中未添加二價金屬離子所純化之，並經由添加螯合劑 8-Hydroxyquinoline-5-sulfonic acid (8-HQSA) 進行透析製備 apo-ALLase。將 ALLase 以透析方式去除雜金屬，再重新與所要的金屬螯合，對其活性影響順序為 $Mn^{2+} \gg Co^{2+} > Zn^{2+} > Cd^{2+} \geq Mg^{2+} \geq Ca^{2+} \geq Ni^{2+}$ ，此結果與圖3-1相比較後，而判斷可能因為 Mn^{2+} 金屬輔因子的原子半徑相較於其他6種金屬輔因子還要小，更易於重新與 ALLase 鍵結。

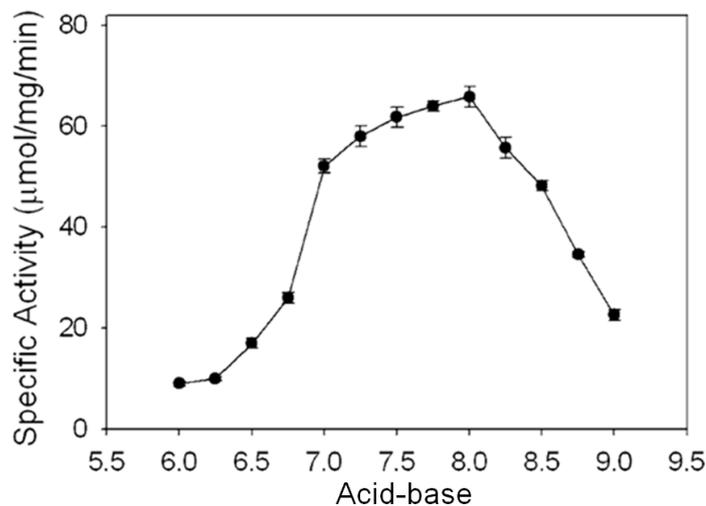


圖3-4：Effect of acid-base on activity of Mn^{2+} -activated ALLase. 酸鹼催化適性研究 (acid-base catalysis study) 是探討 ALLase 在不同的酸鹼環境下之活性 (pH 6.0-9.0)，可得知 ALLase 最適環境在 pH 8，並據之推測其化學催化機制。

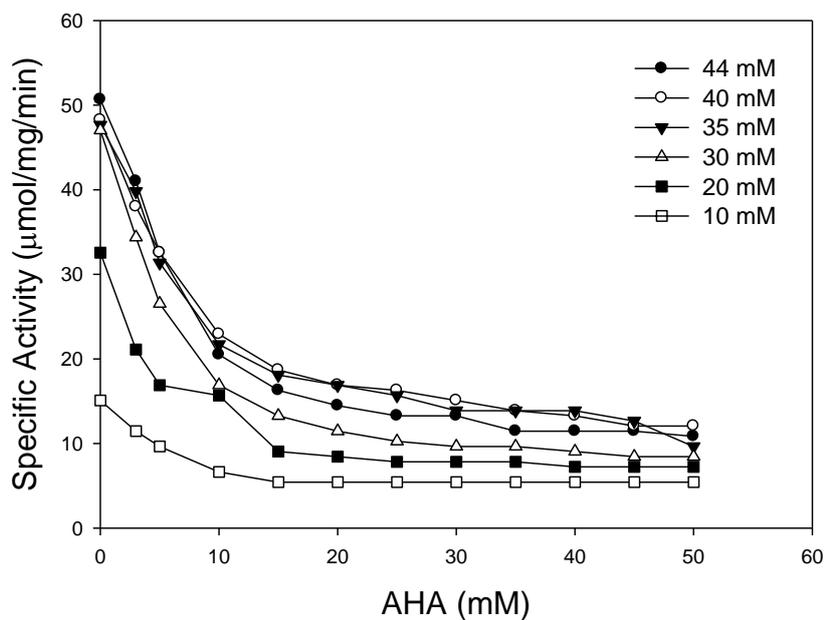


圖3-5：Mn²⁺-activated ALLase 在 Acetohydroxamic acid (AHA) 加入後，觀察其抑制反應之活性分析；加入 AHA 後，活性隨著 AHA 濃度上升而明顯下降，即使增加其受質 allantoin 的濃度也僅能降低 AHA 其抑制的程度。

第四章 突變株各項特性分析

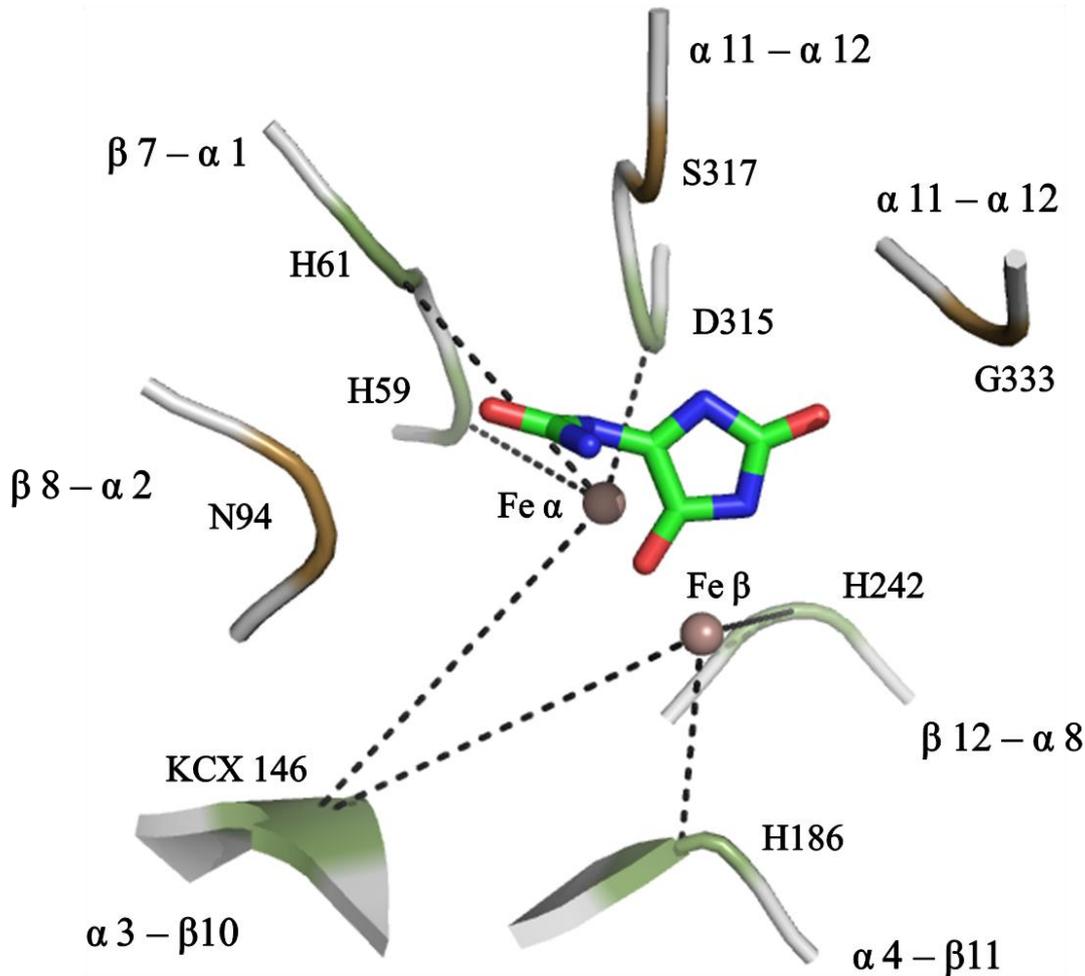


圖 4-1：突變株分三部分：metal-related、substrate-related、K146-related。
metal-related：H186A, H59A, H61A, D315A, D315E；substrate-related：N94A, S317A, N94A/S317A；K146-related：K146A, K146D, K146C, K146H。
H59A、H61A 位於 $\beta 7 - \alpha 1$ ；N94 位於 $\beta 8 - \alpha 2$ ；KCX146 位於 $\alpha 3 - \beta 10$ ；
H186 位於 $\alpha 4 - \beta 11$ ；H242 位於 $\beta 12 - \alpha 8$ ；D315、S317 位於 $\alpha 11 - \alpha 12$ 。

Enzyme	Specific Activity ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)
Wild-type	74.19 ± 1
H186A	$< 10^{-3}$
H61A	$< 10^{-3}$
H59A	$< 10^{-3}$
D315A	0.55 ± 0.1
D315E	0.72 ± 0.1
N94A	$< 10^{-3}$
S317A	1.81 ± 0.2
N94A/S317A	$< 10^{-3}$
K146A	$< 10^{-3}$
K146D	2.94 ± 0.1
K146C	4.56 ± 0.1
K146H	$< 10^{-3}$

表4-1：對沙門氏菌的尿囊素水解酵素的定點突變分析。H59、H61、H186、D315與K146為可能的金屬結合位，突變後活性皆大幅喪失；N94與S317為可能重要受質結合位，突變後活性亦大幅喪失。值得注意的是，K146C仍有相當的活性($4.5 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)，由於此突變株理論上僅會有一個金屬結合位，是否暗示雙金屬中心不為必需條件仍有探討的空間。

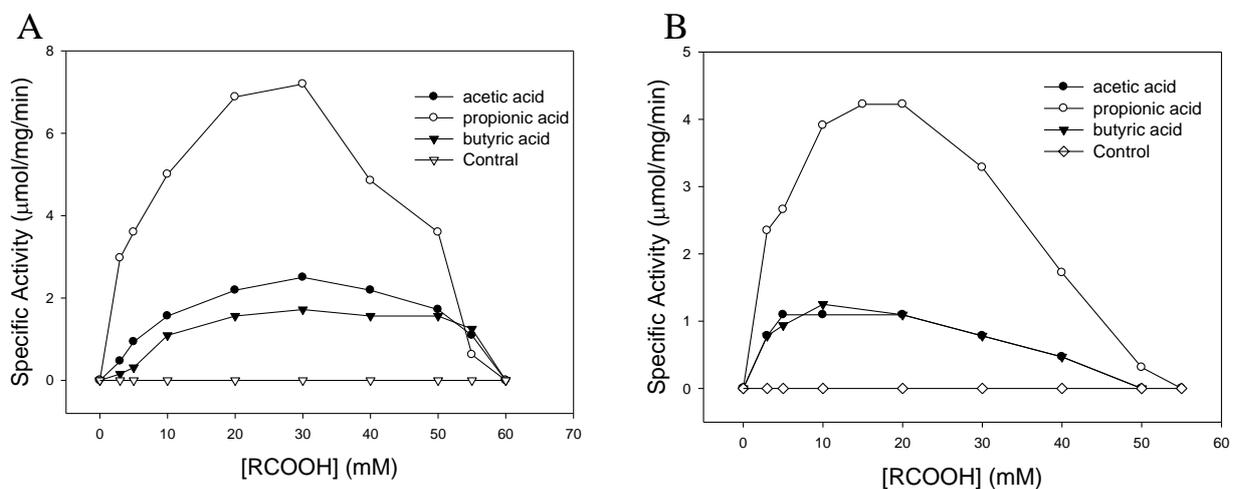


圖4-2：A, Co²⁺-activated ALLase; B, Mn²⁺-activated ALLase。K146突變株

的活性可藉由化學法回復。原不具活性的K146 (此突變株可能不具有後羧化修飾) 可藉由在反應中加入acetic acid、propionic acid 與 butyric acid這些各種長度的羧基化合物回復其活性 (最高約為野生株的1/10), 表示此後修飾對活性相當重要。

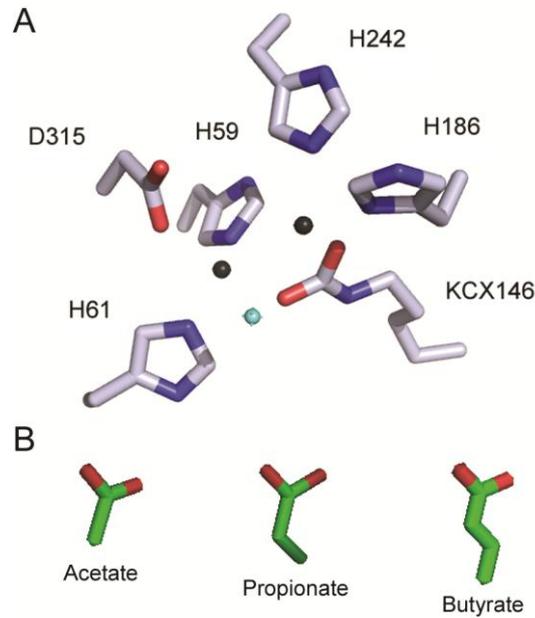


圖4-3：A, KCX146與相關金屬鍵結的胺基酸; B,三種短鏈羧酸。可藉由在反應中加入acetic acid、propionic acid 與 butyric acid這些各種長度的羧基化合物回復其活性，表示此後修飾對活性相當重要且可逆。

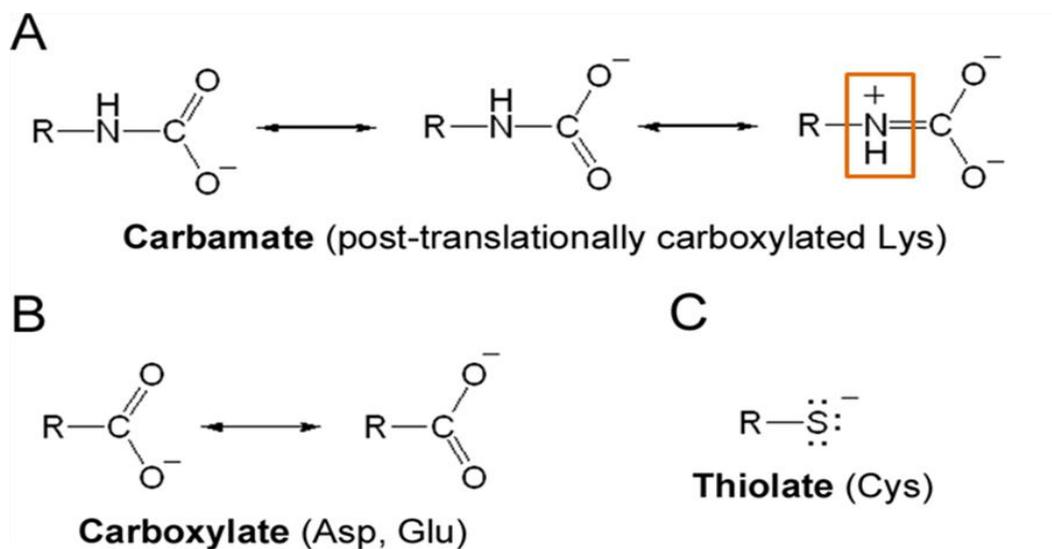


圖4-4：在化學定義上，(B) carboxylate 是指 Lys 只有一個帶負電的支鏈

(A)但為了生理上的必要性而演化出 carbamate (N帶正電) 這個現象，使新型胺基酸 KCX 帶2個負電支鏈，(C) 而不必再額外演化其它的胺基酸協助，便可使其酵素活性更高。

ConSurf Results

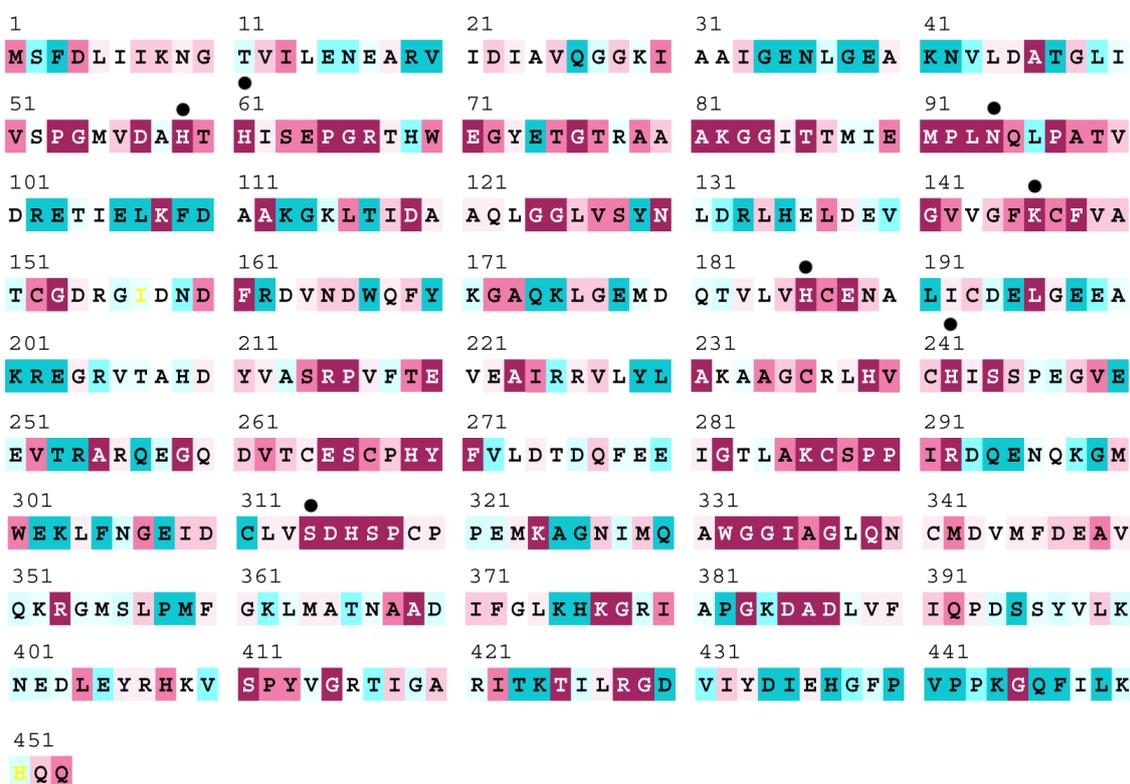


圖4-5：除了突變的分析，ConSurf Server 的分析結果證明此 Lys 在 ALLase 家族中極為高度的保留，因此 KCX (carboxylated Lys) 在演化上可能為一新型的胺基酸，用以得到更高活性的雙金屬中心，而不使用一般所認知的金屬結合胺基酸，如Cys、Asp、His與Glu。此分析計算參考了65種unique sequences。

第五章 抑制劑分析與篩選

5-1 受質類似物的水解與結合分析

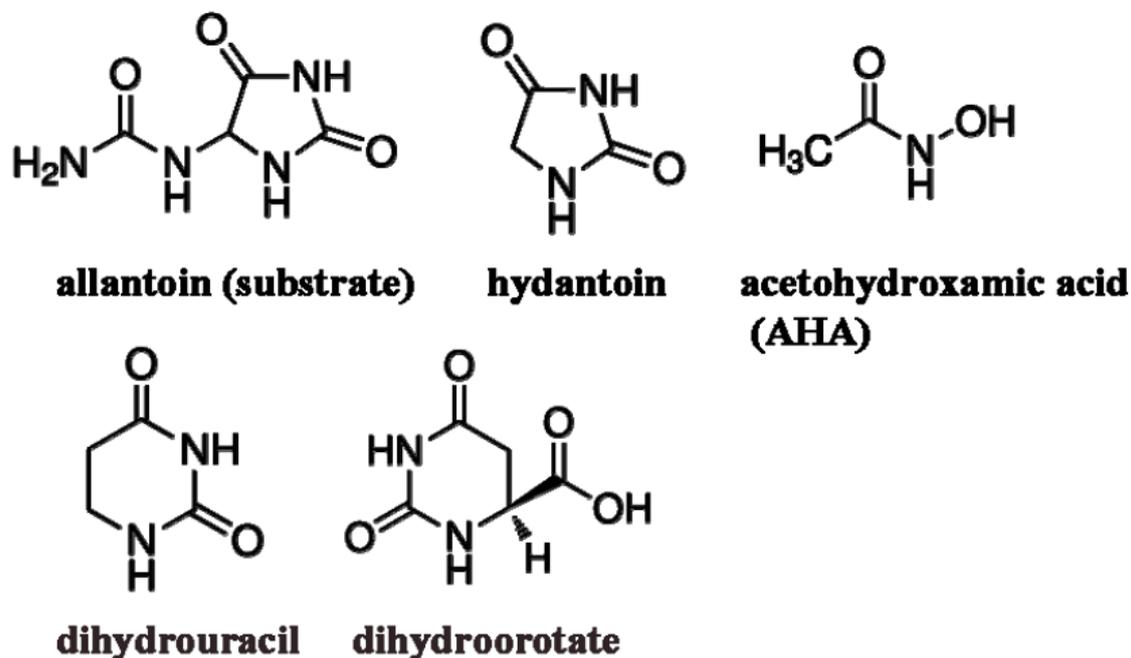
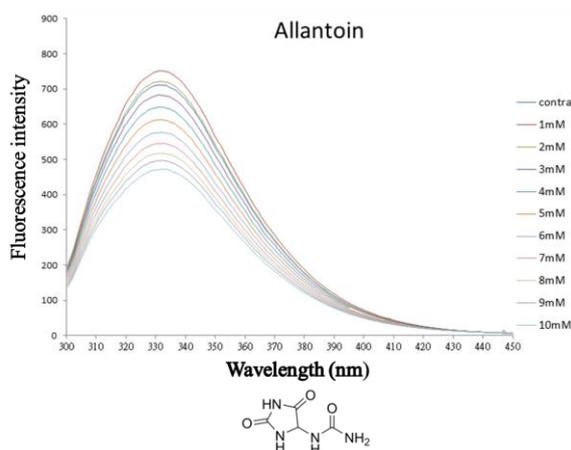


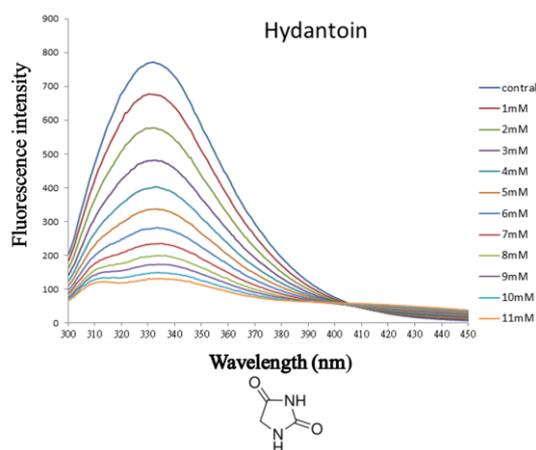
圖 5-1：沙門氏菌尿囊素水解酵素的受質特異性。我們已發現雖然此尿囊素水解酵素能結合這些不同環狀或官能基的類似物，然僅能催化 allantoin 的水解反應。

A *St* ALLase (fluorescence quench)

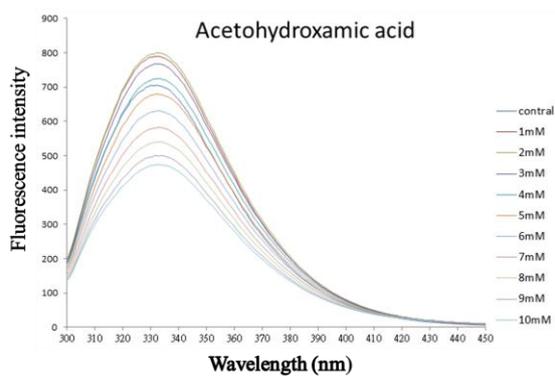
I



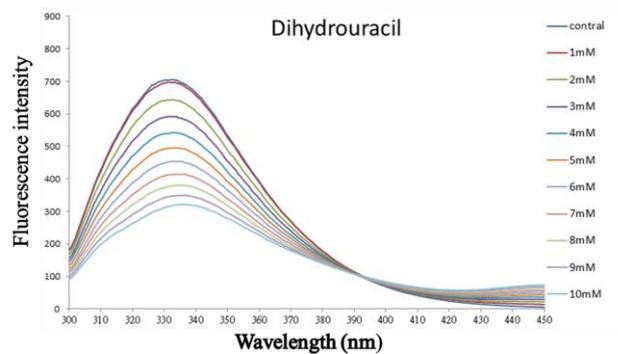
II



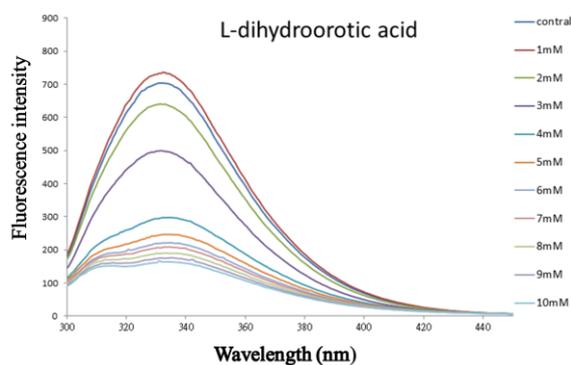
III



VI

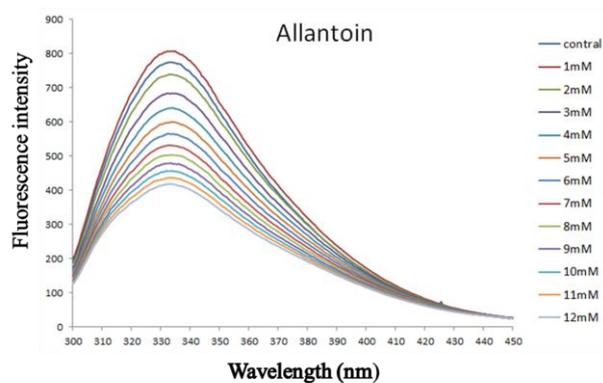


V

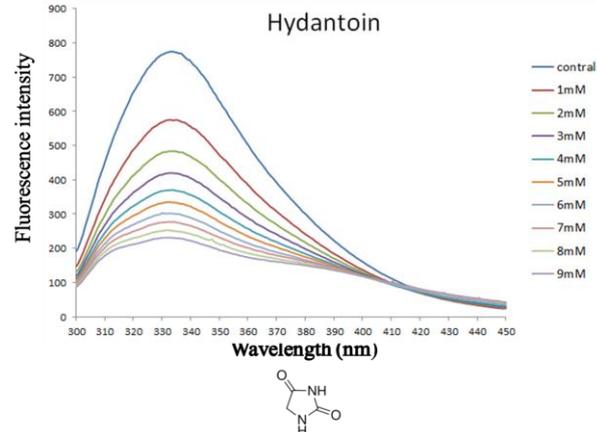


B *St* ALLase K146A (fluorescence quench)

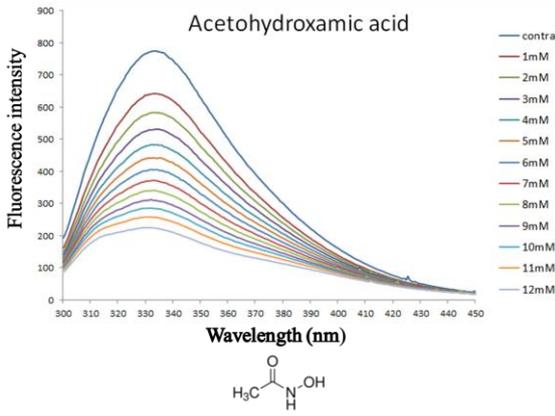
I



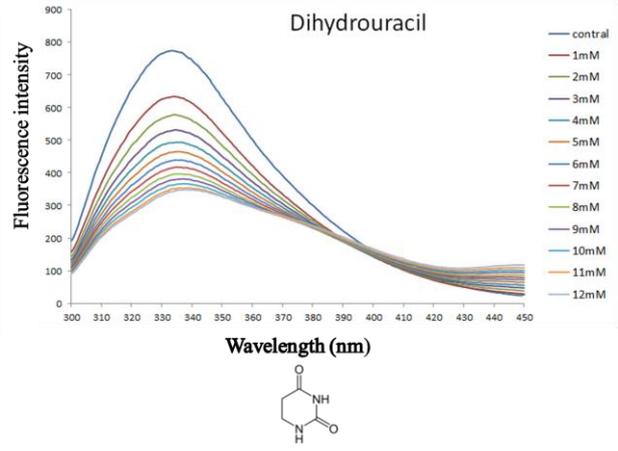
II



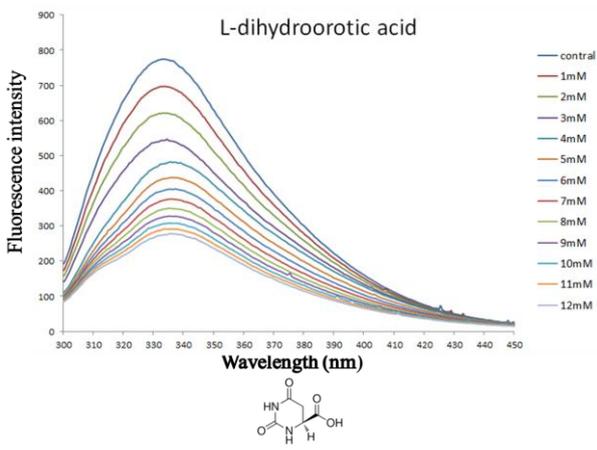
III



IV

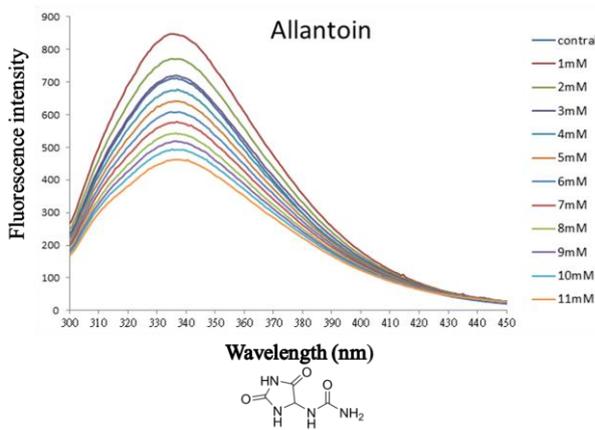


V

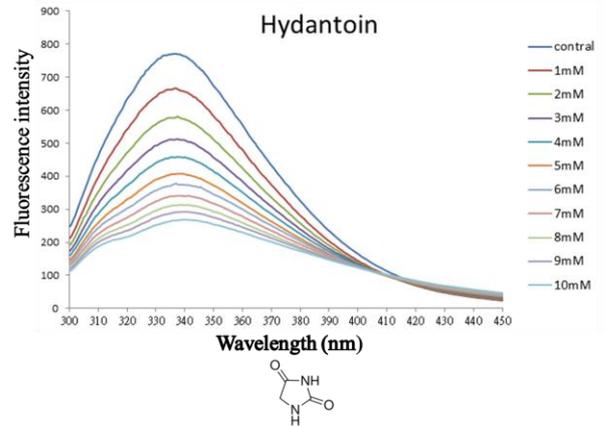


C *St* ALLase S317A (fluorescence quench)

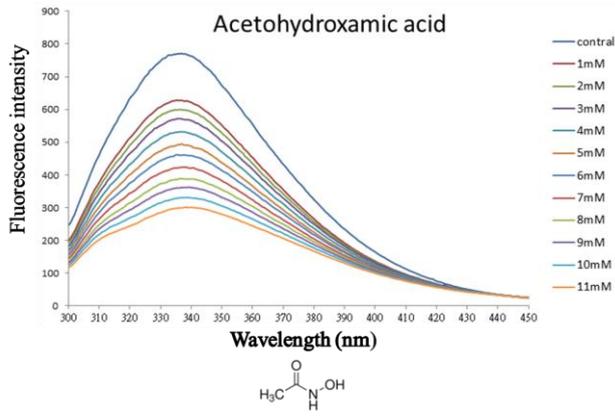
I



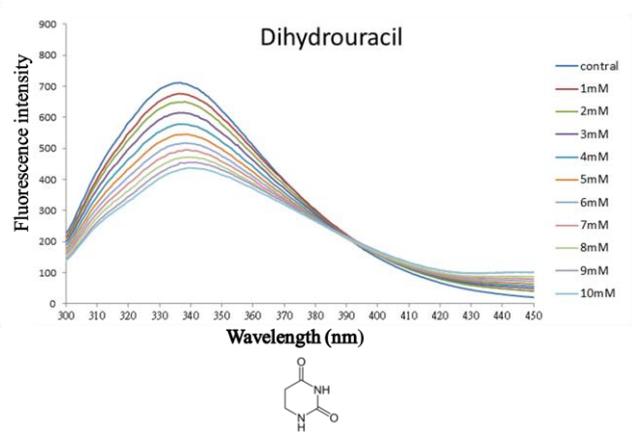
II



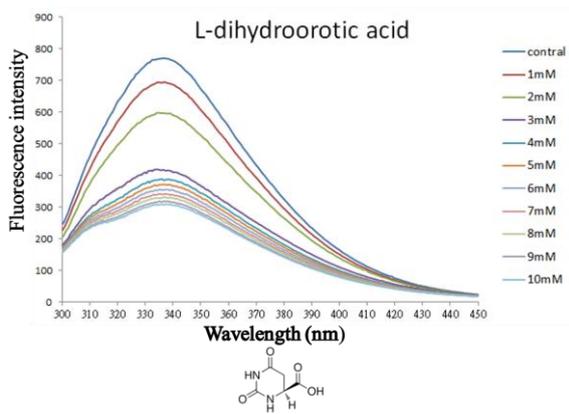
III



VI

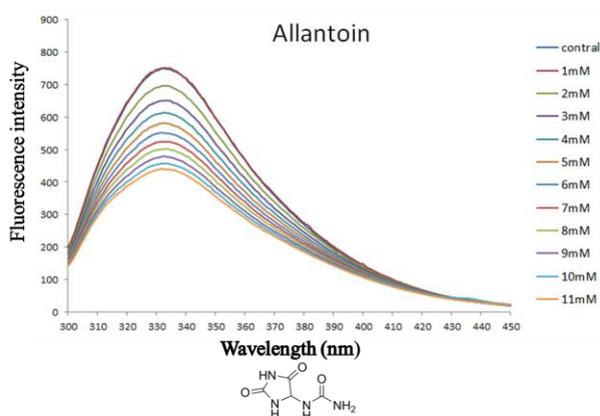


V

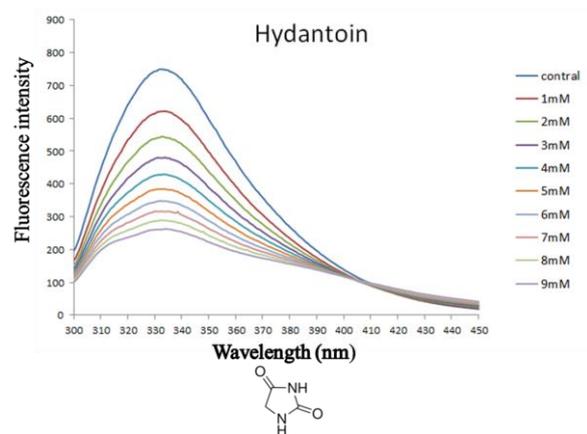


D *St* ALLase N94A/S317A (fluorescence quench)

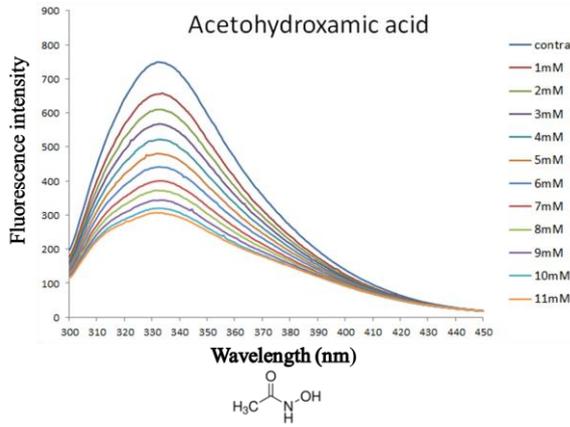
I



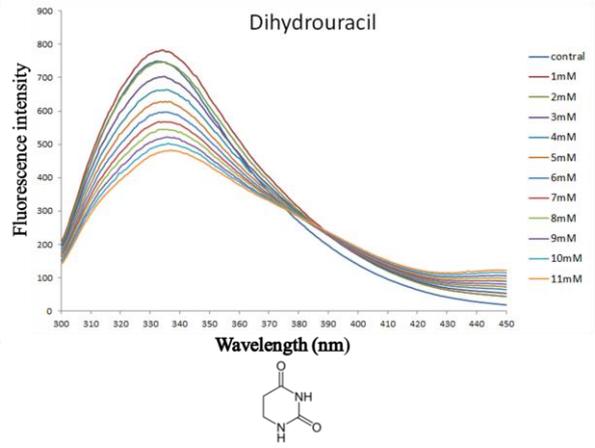
II



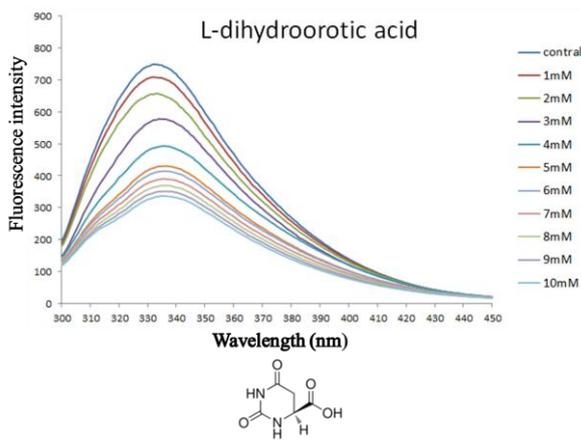
III



VI

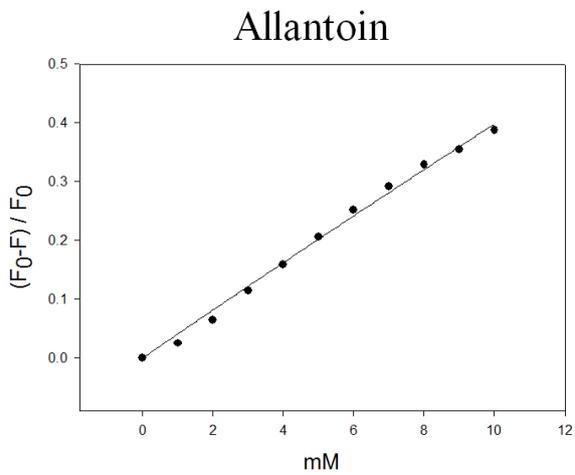


V

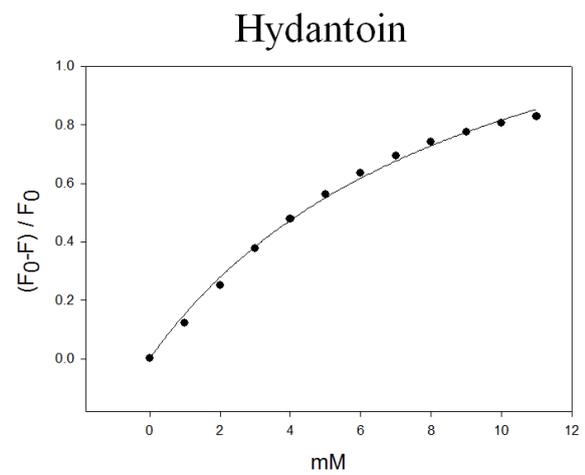


E *St* ALLase

I

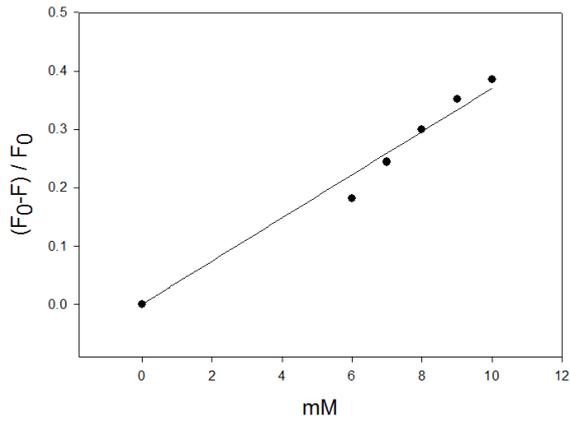


II



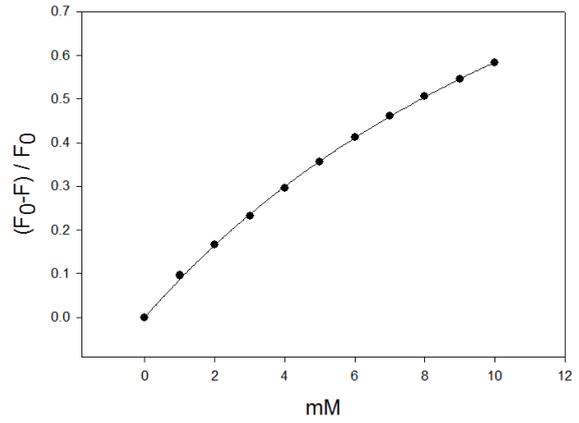
III

Acetohydroxamic acid



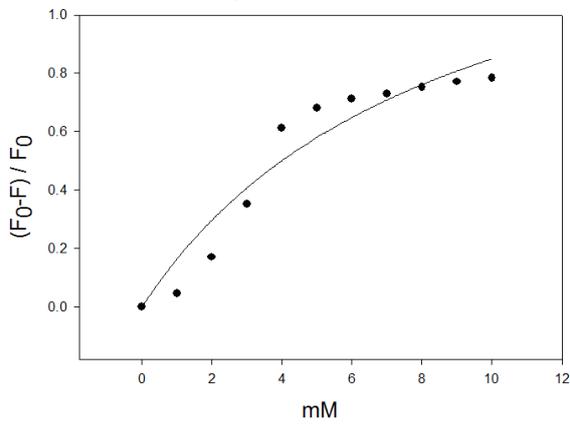
VI

Dihydrouracil



V

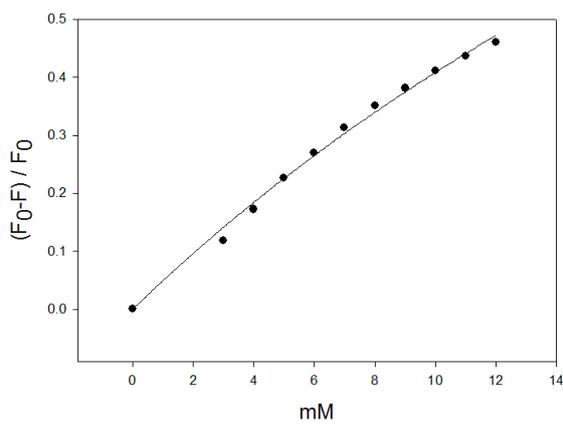
L-dihydroorotic acid



F *St* ALLase K146A

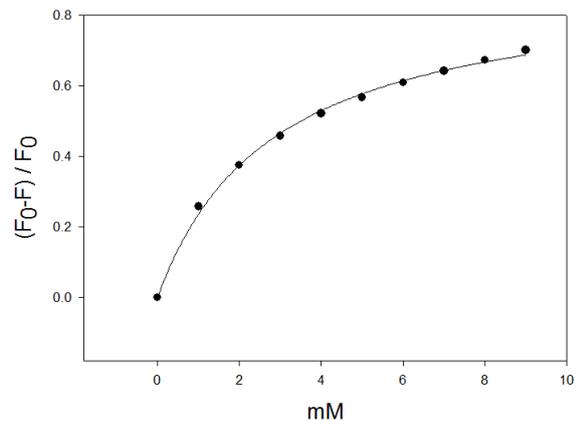
I

Allantoin



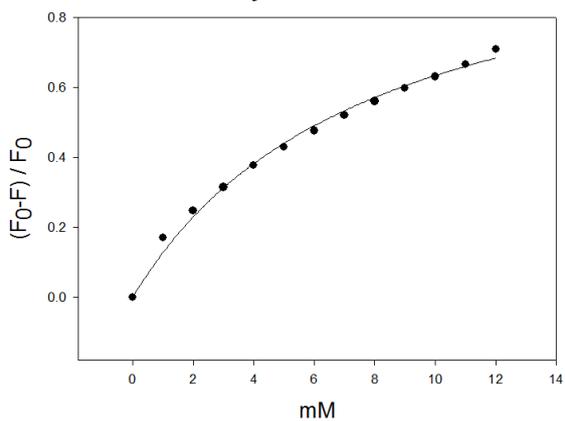
II

Hydantoin



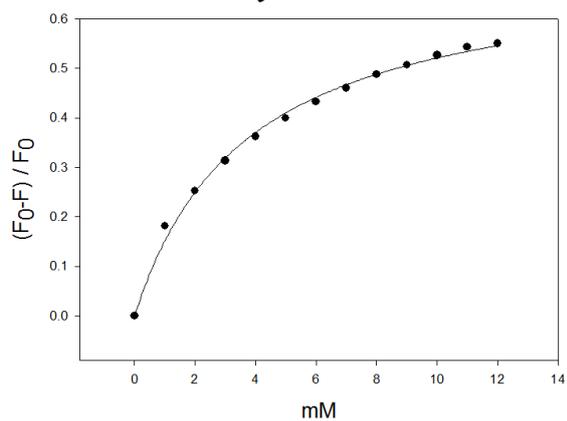
III

Acetohydroxamic acid



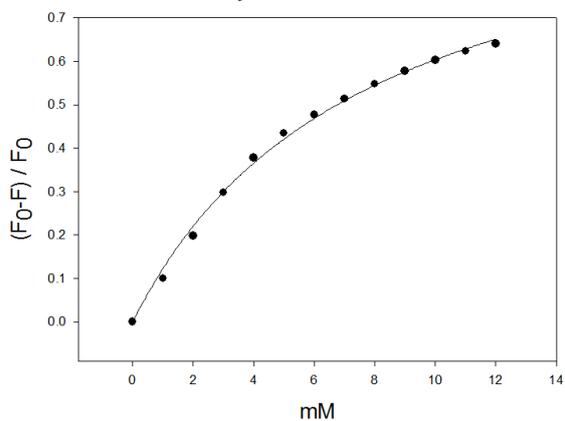
VI

Dihydrouracil



V

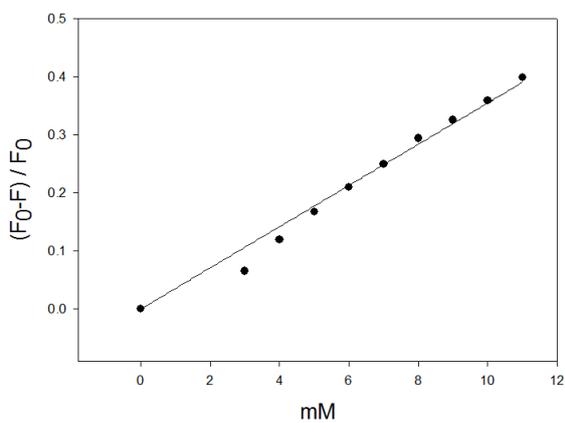
L-dihydroorotic acid



G *St* ALLase S317A

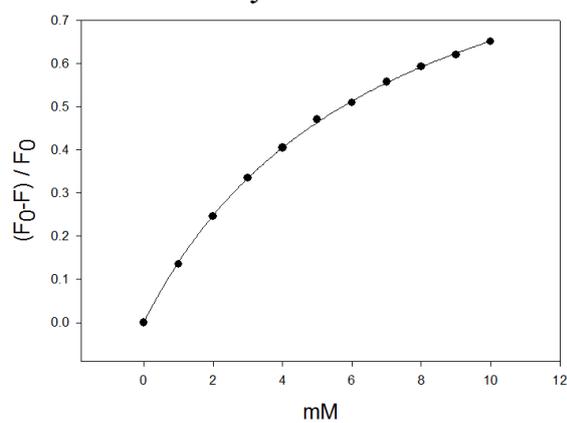
I

Allantoin



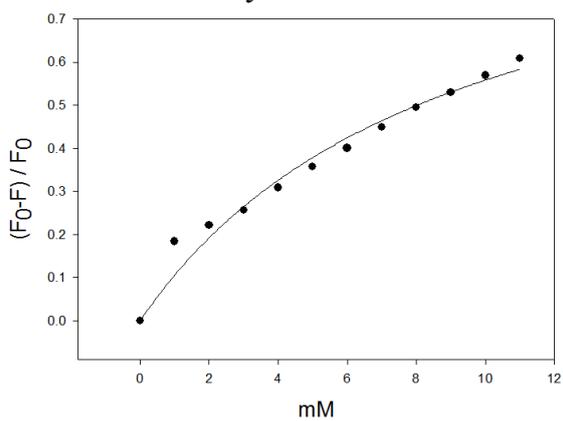
II

Hydantoin



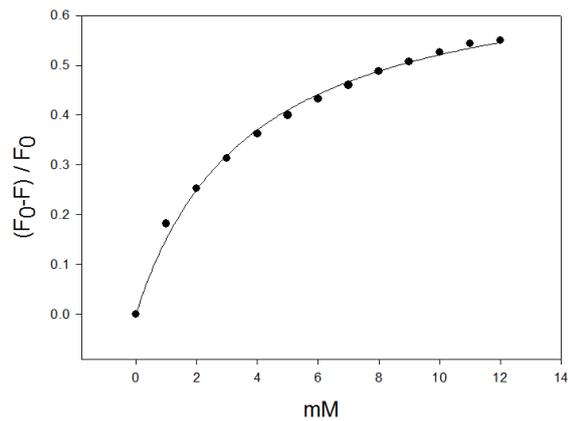
III

Acetohydroxamic acid



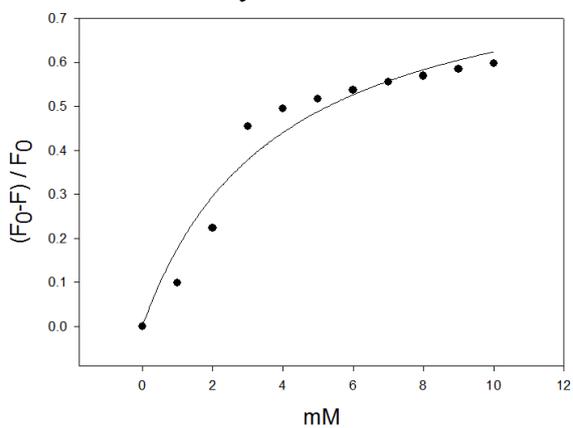
VI

Dihydrouracil



V

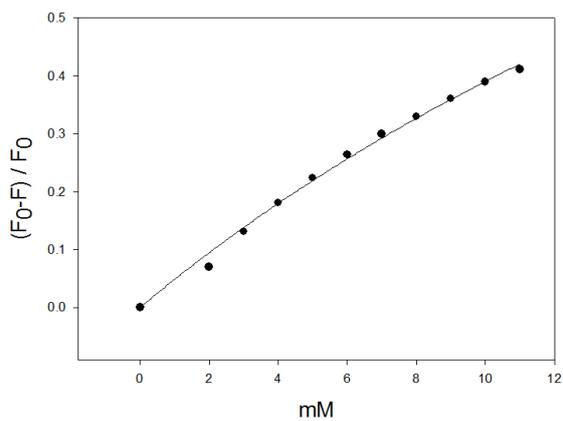
L-dihydroorotic acid



H *St* ALLase N94A/S317A

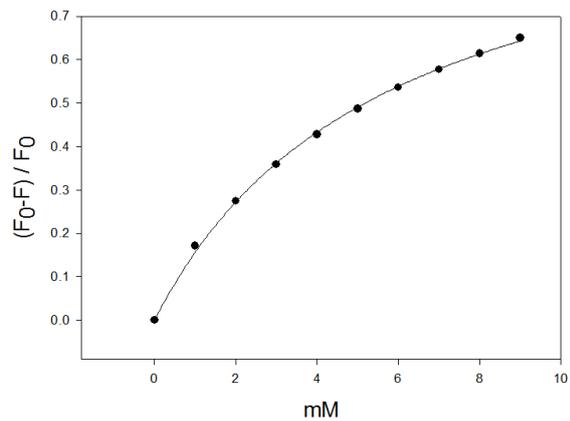
I

Allantoin

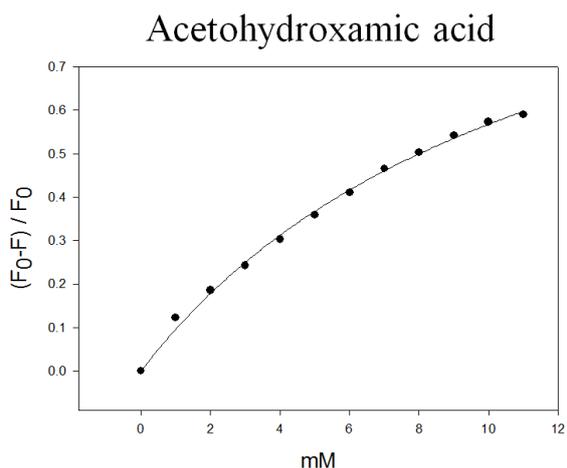


II

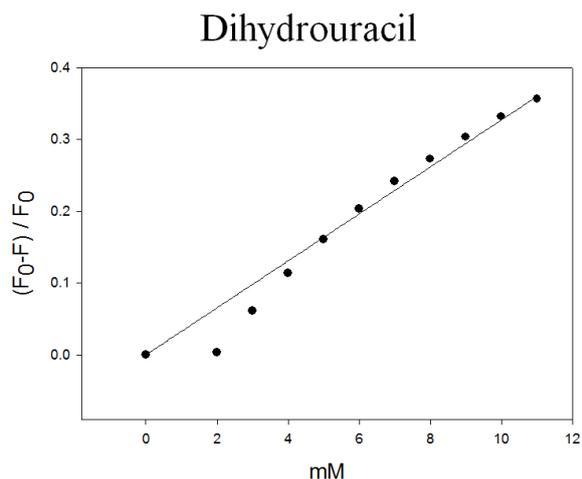
Hydantoin



III



VI



V

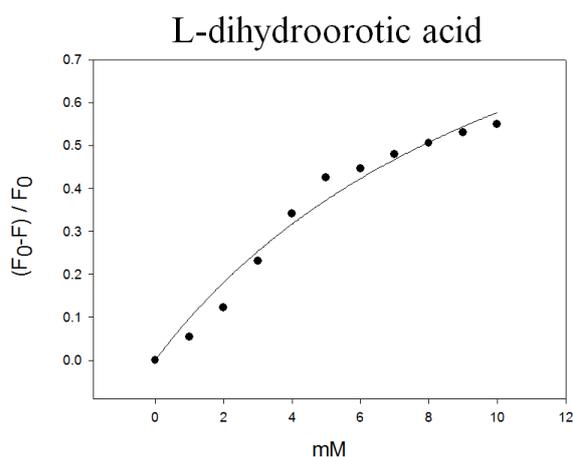


圖 5-2：A-H，在不同濃度的尿囊素 (allantoin) 與受質類似物 hydantoin、dihydrouracil、L-dihydroorotic acid 以及與試劑 AHA 之下，對沙門氏菌尿囊素水解酵素之螢光淬滅的效果。螢光共振能量轉移法：使用螢光光譜儀偵測 ALLase 與其抑制劑或受質類似物之結合反應，並求出其各 K_d 值，進一步探討其受質特異性：ALLase 雖然能結合這些受質類似物，但僅能催化 allantoin 的水解反應，並推論 ALLase 在嘌呤代謝中，可能會協同與其他受質類似物的水解酵素產生反應。

ALLase

Substrate	K_d (mM)
allantoin	$3.068 \times 10^2 \pm 6.641 \times 10^2$
AHA	$4.471 \times 10^7 \pm 4.565 \times 10^{13}$
hydantoin	9.349 ± 0.9180
L-dihydroorotic acid	8.662 ± 4.2130
dihydrouracil	17.16 ± 0.7208

表 5-1：St ALLase 與試劑、受質類似物之 K_d 值。

ALLase K146A

Substrate	K_d (mM)
allantoin	43.0100 ± 11.7800
AHA	7.8580 ± 0.8192
hydantoin	2.8250 ± 0.1682
L-dihydroorotic acid	7.6860 ± 0.5641
dihydrouracil	3.7220 ± 0.2533

表 5-2：St ALLase K146A 與試劑、受質類似物之 K_d 值。

ALLase S317A

Substrate	K_d (mM)
allantoin	$4.3 \times 10^7 \pm 2.296 \times 10^{13}$
AHA	9.032 ± 2.130
hydantoin	6.862 ± 0.1632
L-dihydroorotic acid	3.848 ± 1.1620
dihydrouracil	7.73 ± 1.0800

表 5-3：St ALLase S317A 與試劑、受質類似物之 K_d 值。

ALLase N94A/S317A

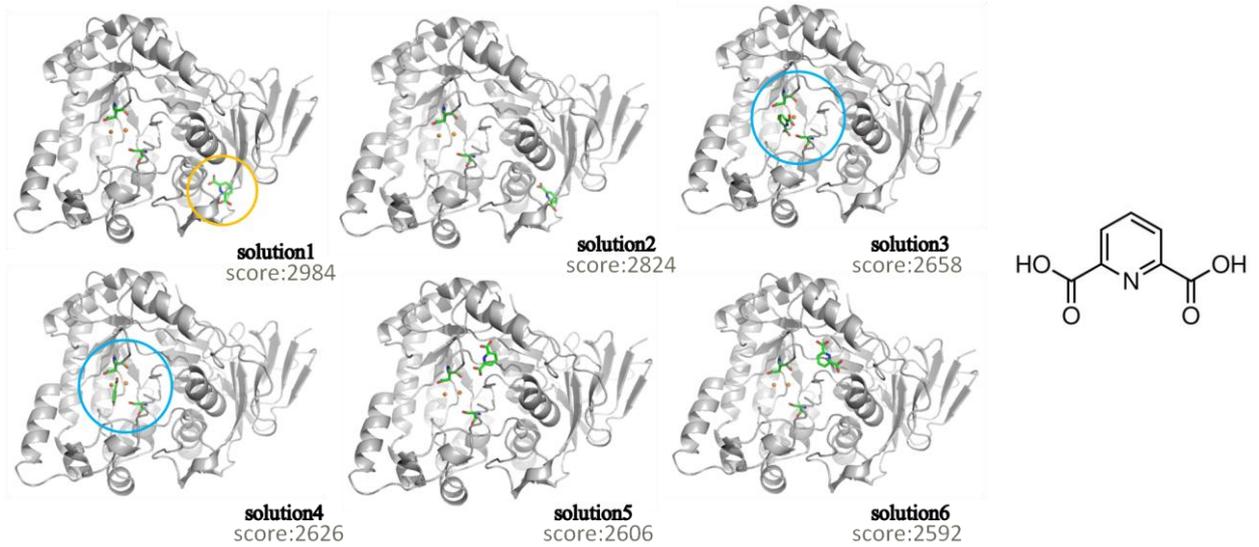
Substrate	K_d (mM)
allantoin	36.0500 ± 8.9580
AHA	11.9800 ± 1.1190
hydantoin	5.7230 ± 0.2527
L-dihydroorotic acid	12.1000 ± 4.0980
dihydrouracil	$4.438 \times 10^7 \pm 3.20310^{13}$

表 5-4：St ALLase N94A/S317A 與試劑、受質類似物之 K_d 值。

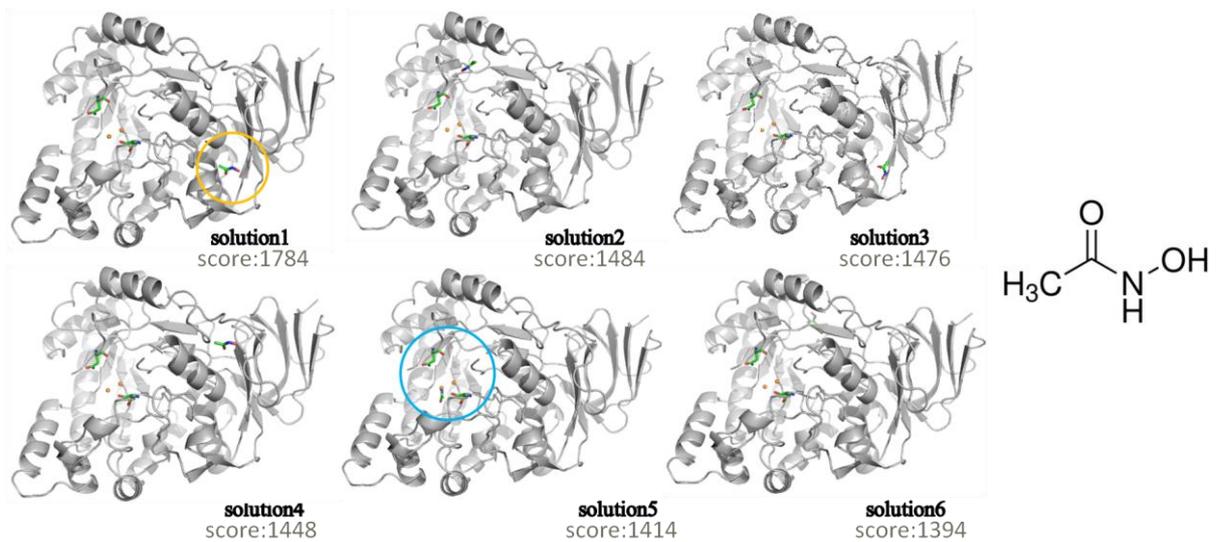
表 5-1 與表 5-2、表 5-3 以及表 5-4 做結果分析：由 K_d 值比較，得知 K146A 與 Hydantoin 結合，更有明顯的螢光強度下降；ALLase 經由點突變後，以致對受質辨識度降低而無法真正水解 AHA，導致 AHA 逐量增加對 ALLase 產生螢光遮蔽而螢光強度下降；相較其它樣本株 K_d 值，S317A 突變株對 L-dihydroorotic acid 而言更輕易結合，但無法被水解而螢光強度下降；由兩種突變株 S317A 和 N94A/S317A 相比較對 Dihydrouracil 結合力的 K_d 值，可得知 N94 和 S317 對受質的重要性。探討其受質特異性：ALLase 雖然能結合這些受質類似物，但僅能催化 allantoin 的水解反應，並推論 ALLase 在嘌呤代謝中，可能會協同與其他受質類似物的水解酵素產生反應，已達到生理代謝的必須性。

5-2 結構模擬與 docking 分析

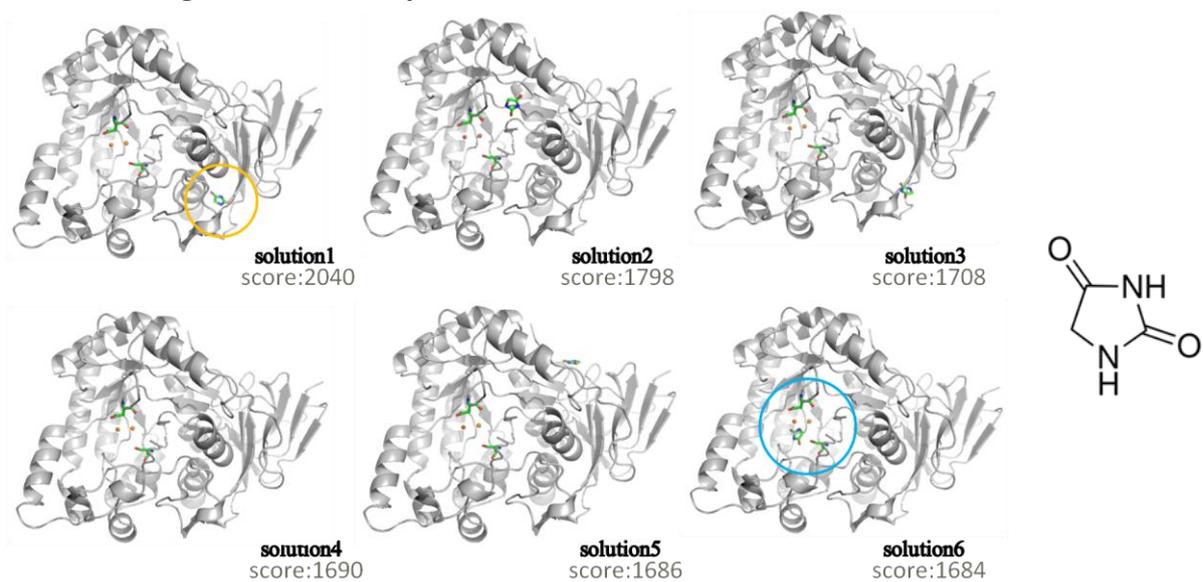
A Docking: ALLase & 2,6-pyridinedicarboxylic acid



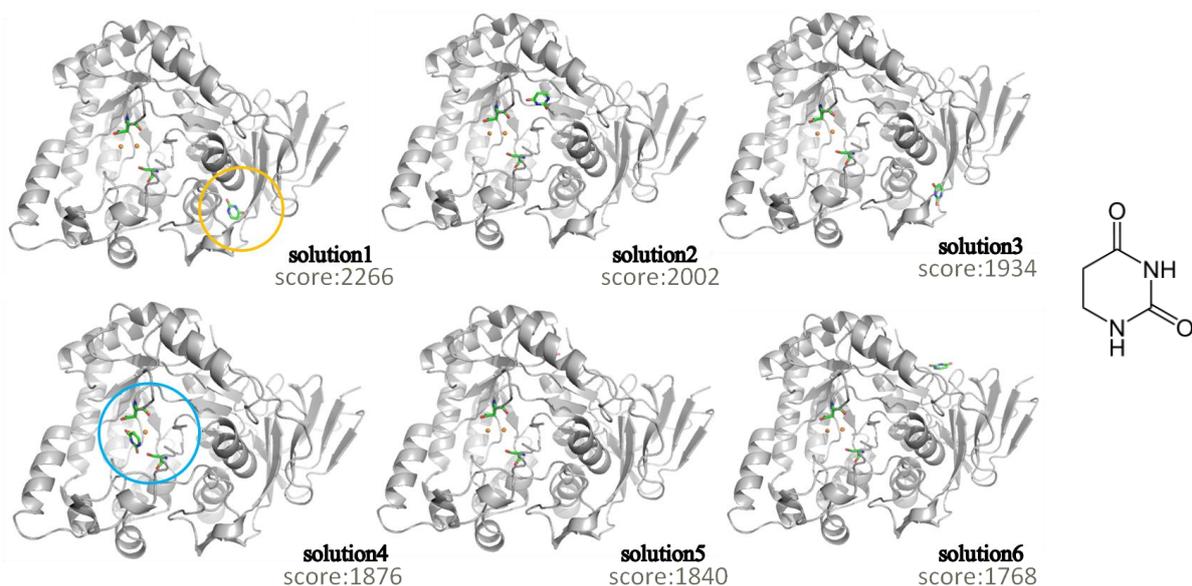
B Docking: ALLase & aceto-hydroxamic acid



C Docking: ALLase & hydantoin



D Docking: ALLase & dihydrouracil



E Docking: ALLase & L-dihydroorotic acid

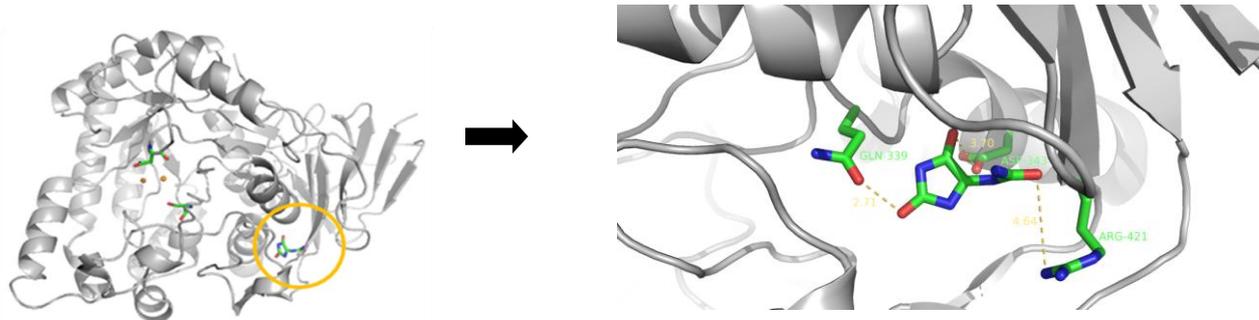


圖5-3：A-E, 蛋白質與藥物小分子結合位置預測。

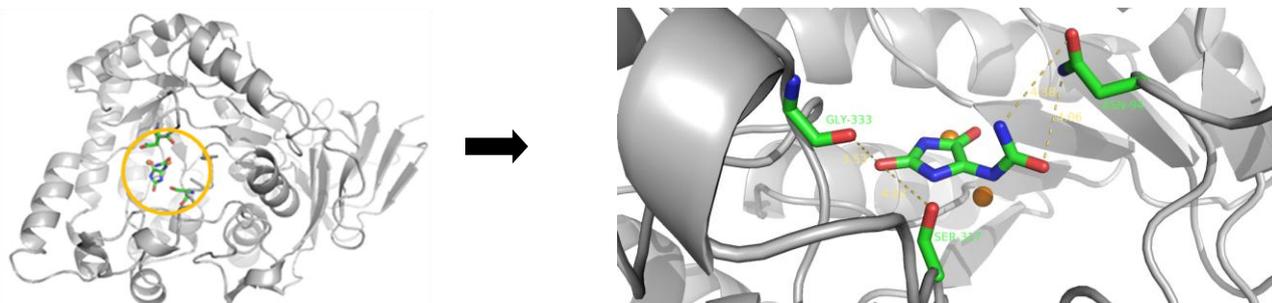
Regent & Analogues	solution1	solution2	solution3	solution4	solution5	solution6
2,6-Pyridinedicarboxylic acid	2984	2824	2658	2626	2606	2592
Acetohydroxamic acid	1784	1484	1476	1448	1414	1394
Hydantoin	2040	1798	1708	1690	1686	1684
Dihydrouracil	2266	2002	1934	1876	1840	1768
L-Dihydroorotic acid	2634	2524	2452	2430	2362	2246

表5-5：蛋白質與藥物小分子結合位置預測之score。

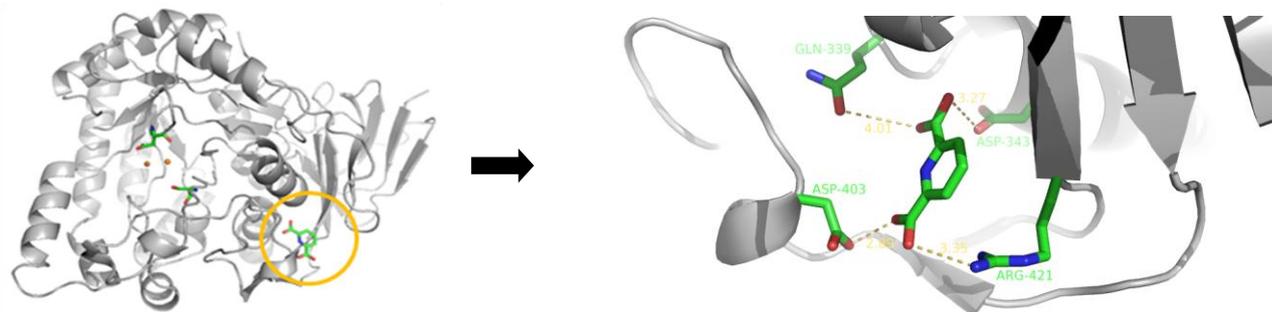
A allantoin : solution1



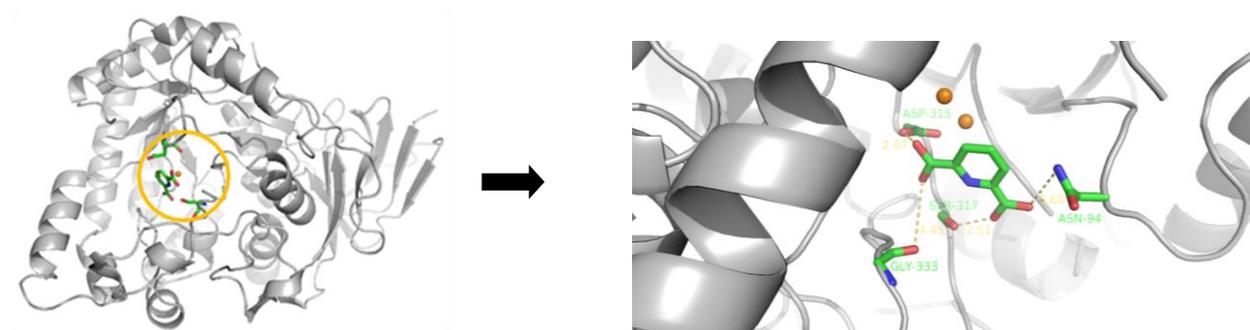
B allantoin : solution5



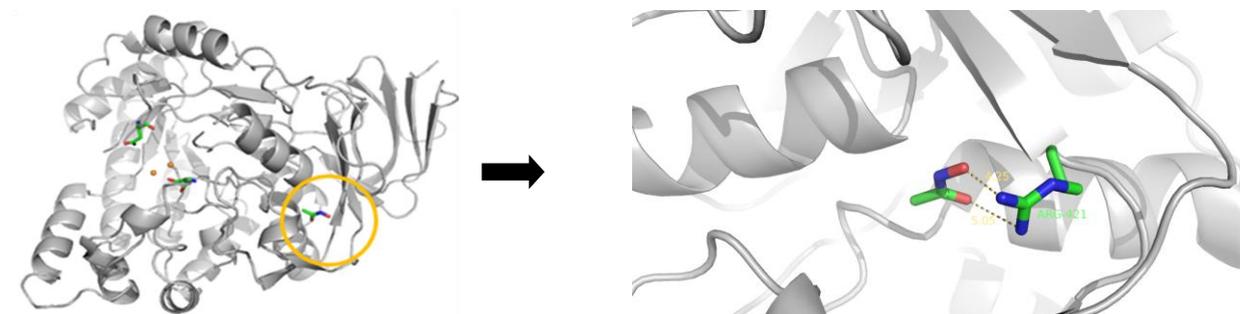
C 2,6-pyridinedicarboxylic acid : solution1



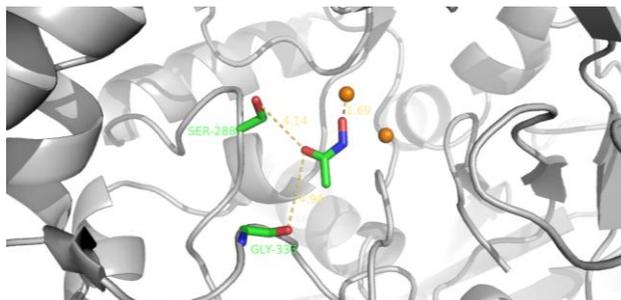
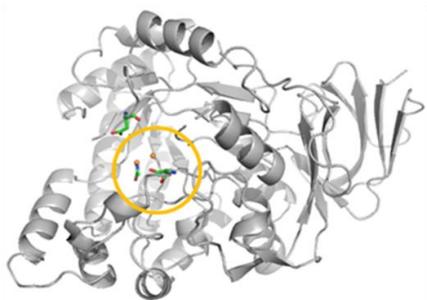
D 2,6-pyridinedicarboxylic acid : solution3



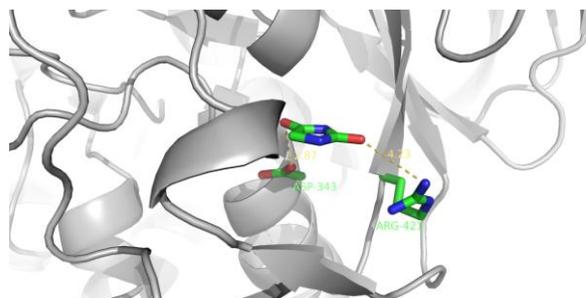
E aceto hydroxamic acid : solution1



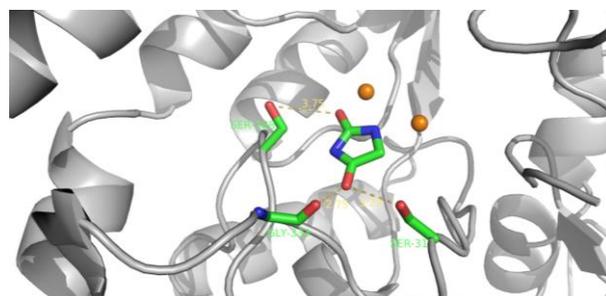
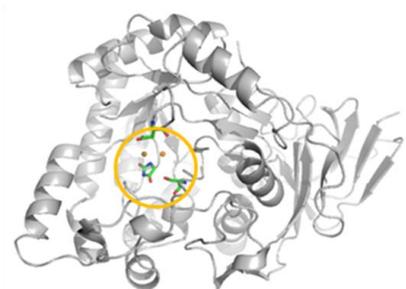
F acetohydroxamic acid : solution5



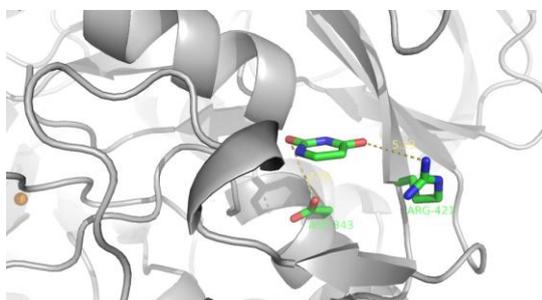
G hydantoin : solution1



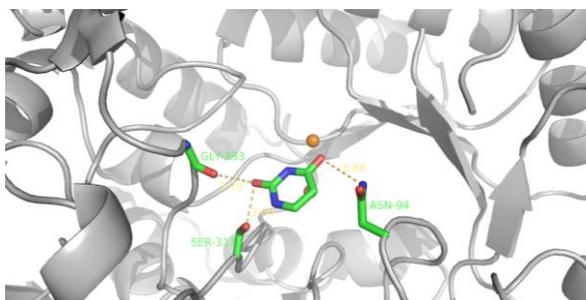
H hydantoin : solution6



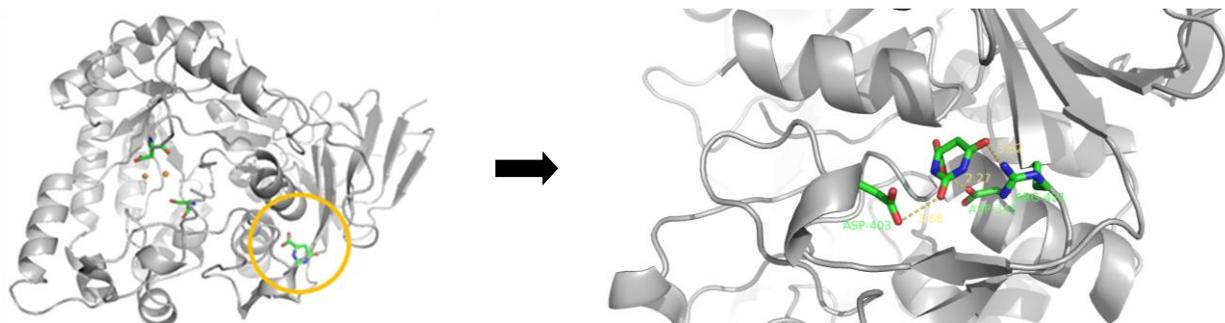
I dihydrouracil : solution1



J dihydrouracil : solution4



K L-dihydroorotic acid : solution1



L L-dihydroorotic acid : solution4

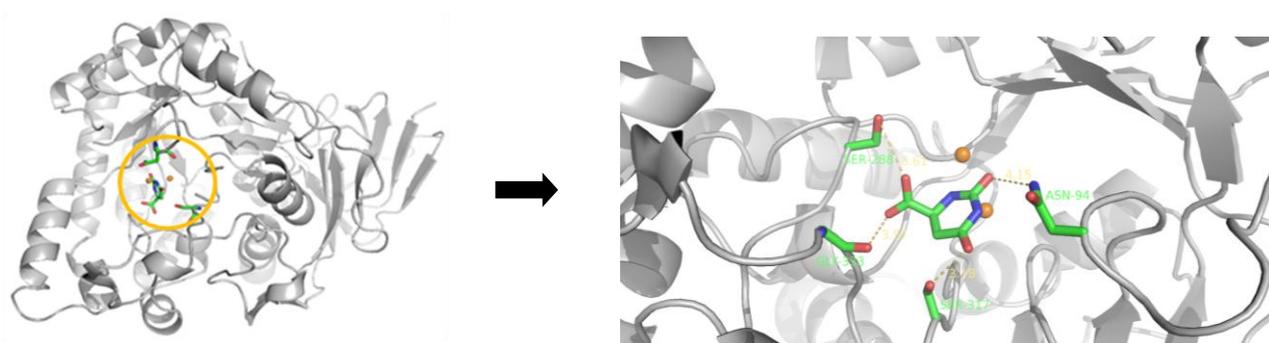


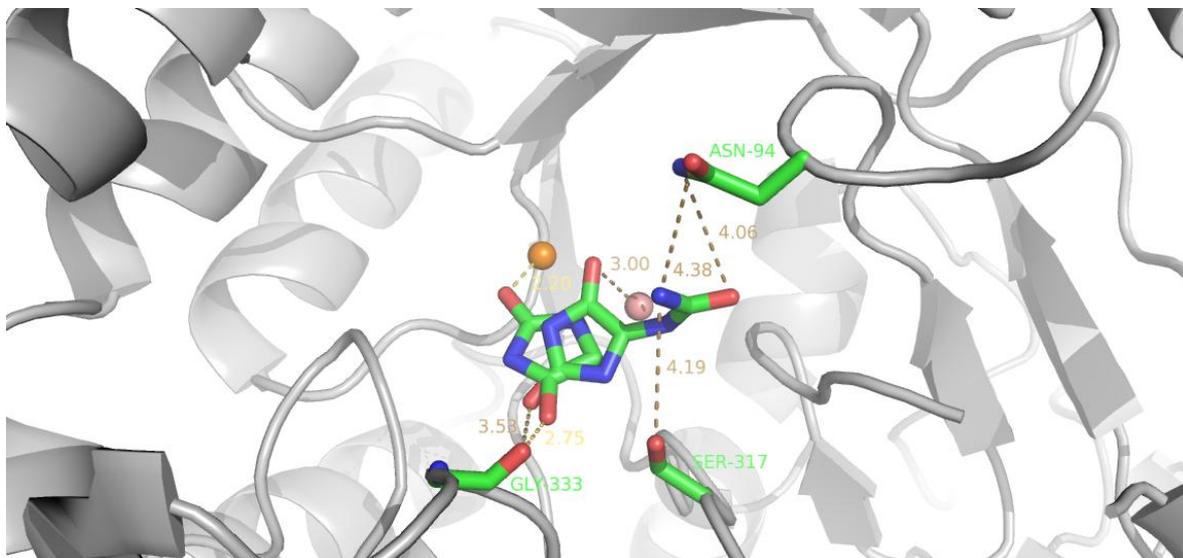
圖5-4：A-L，預測藥物小分子與胺基酸鍵結位。

藥物小分子	胺基酸鍵結位
Allantoin : solution1	Gln339, Asp343, Arg421
Allantoin : solution5	Asn94, Ser317, Gly333
2,6-Pyridinedicarboxylic acid : solution1	Gln339, Asp343, Asp403, Arg421
2,6-Pyridinedicarboxylic acid : solution3	Asn94, ASP315, Ser317, Gly333
Acetohydroxamic acid : solution1	Arg421
Acetohydroxamic acid : solution5	Ser288, Gly333
Hydantoin : solution1	Asp343, Arg421
Hydantoin : solution6	Ser288, Ser317, Gly333
Dihydrouracil : solution1	Asp343, Arg421
Dihydrouracil : solution4	Asn94, Ser317, Gly333
L-Dihydroorotic acid : solution1	Asp403, Asp343, Arg421
L-Dihydroorotic acid : solution4	Asn94, Ser288, Ser317, Gly333

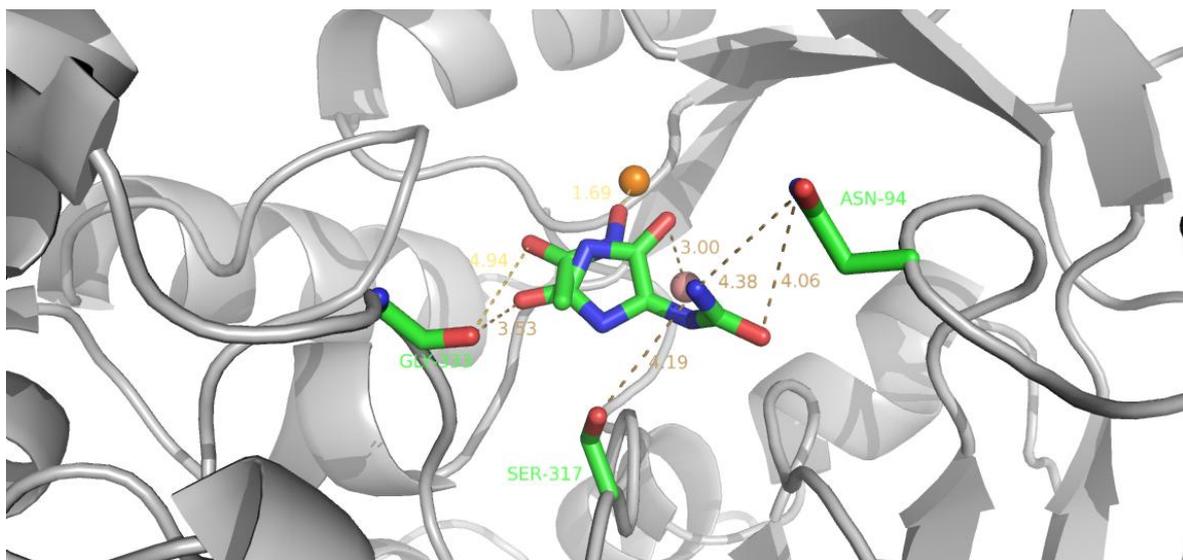
表5-6：預測藥物小分子與胺基酸鍵結位。hydantoin 為五環受質類似；2,6-pyridinedicarboxylic acid、dihydrouracil、L-dihydroorotic acid為六環受質類似物，從結果分析得知，五環的hydantoin 和 acetohydroxamic acid

較不青睞鍵結Asn94，其可能因為為五環以及鏈狀化合物結構，進而影響與胺基酸之間的電子推拉現象，便改變與胺基酸鍵結的角度及方向。

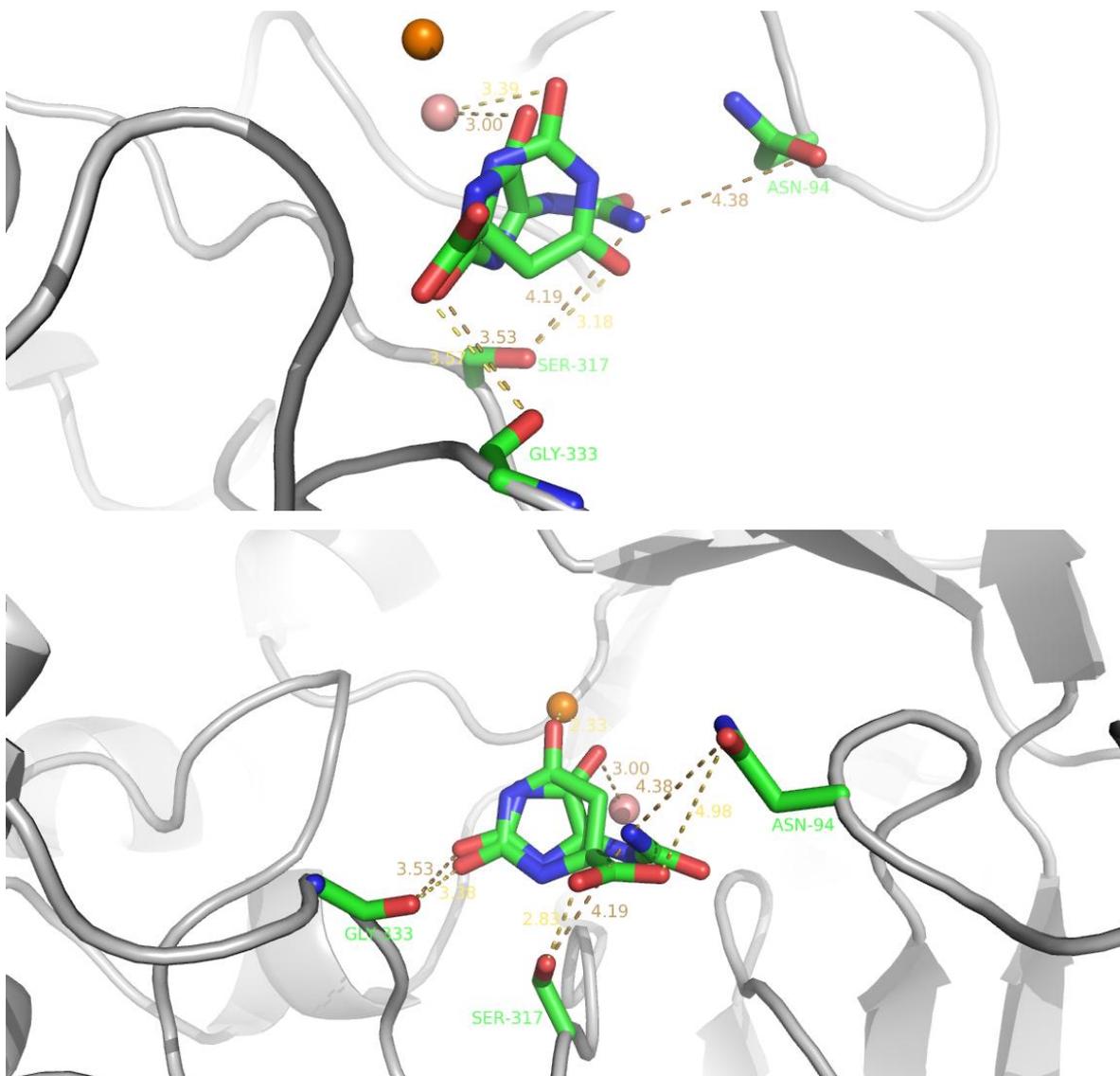
A allantoin & hydantoin (受質類似物)



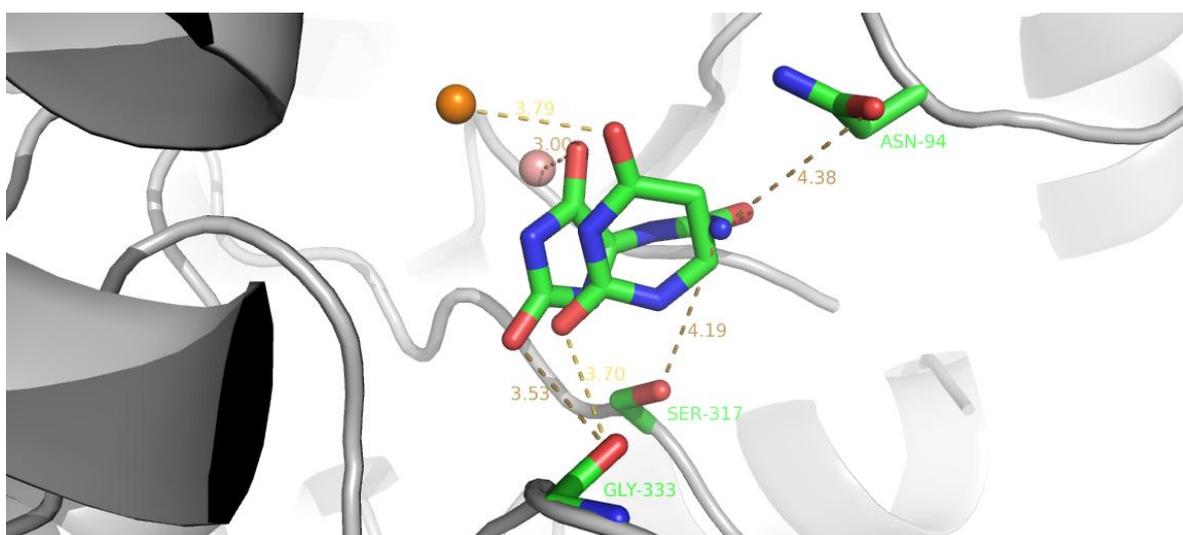
B allantoin & acetoxyhydroxamic acid (抑制劑)



C allantoin & L-dihydroorotic acid{solution4, solution5} (受質類似物)



D allantoin & dihydrouracil (受質類似物)



E allantoin & 2,6-pyridinedicarboxylic acid {solution3, solution4}(螯合劑)

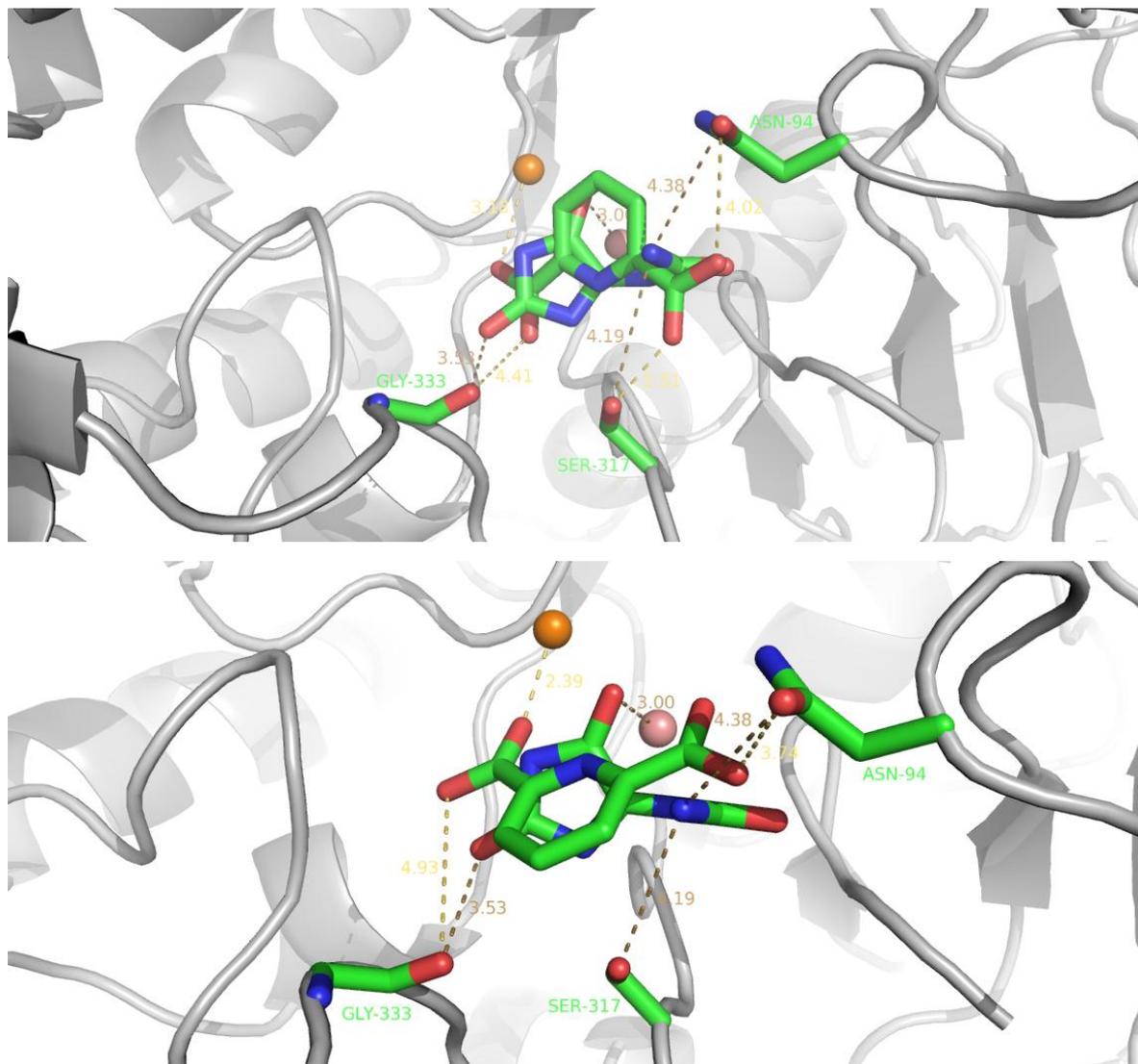


圖5-5：A-E, *St* ALLase 之 Allantoin 與試劑、受質類似物結合位疊圖比較。從疊圖比較分析後，可得知 hydantoin、L-dihydroorotic acid 之 solution5、dihydrouracil 與 allantoin 有較相似的鍵結方向，另外，aceto hydroxamic acid 的鍵結角度從預測圖中卻實呈現干擾尿囊素之水解現象，此抑制劑也可能與尿囊素水解酵素之金屬輔因子做電子推拉而影響催化水解效果。

第六章 結論

尿囊素水解酶 (allantoinase, ALLase) 催化allantoin 水解成allantoic acid，為嘌呤代謝與固氮作用中最關鍵的反應之一。ALLase中心含有2個金屬離子；特別值得注意的是，此活性區的賴胺酸 (Lys) 被不知緣由的羧化後修飾，由正電變為負電並用於鍵結其雙金屬。此產生幾個重要的問題：金屬的功能為何、此後修飾的影響、以及反應機制與活性關聯性。轉譯後修飾是指蛋白質在轉譯後的化學修飾，影響了蛋白質原有功能的官能基，改變胺基酸的化學性質，甚或造成整體結構上的改變。在ALLase，鍵結金屬不使用一般所熟知的負電胺基酸如Asp或Glu，而是用Lys，因此這後修飾之意義與必需性值得進一步探討。

經分析得知，部分金屬同時是活化劑也是抑制劑：Mn、Co、Zn、Cd、Ca、Ni、Mg有不同程度的活化性 (圖3-1)，然加入高濃度的Zn、Cd，產生出有表達但無活性的ALLase。在酸鹼催化適性研究中，可得知ALLase最適環境在pH 8 (圖3-4)。抑制活性之試劑對ALLase而言，其8-HQSA這個螯合劑影響力較為明顯；AHA與受質 (allantoin) 競爭和ALLase結合，影響ALLase的活性表現下降 (圖3-5)。在突變其金屬螯合區胺基酸H186、H61、H59、D315、K146與受質結合胺基酸N94、S317後，酵素活性皆幾乎完全喪失，證明了這些位置的重要性 (圖3-2, 圖4-1, 表4-1)。此外，我們亦驚訝的發現K146A的活性可藉由化學回復 (圖4-2A, 圖4-2B)：將原不具活性的K146A (可能不具有羧化後修飾)，藉著外加各種長度的羧酸 (acetic acid、propionic、acidbutyric acid) 來模擬此後修飾 (圖4-3)，並發現羧酸在同時加入特別的金屬後可協助回復其部分活性，沒金屬即不行。

我們亦進一步利用其抑制劑與受質類似物，研究ALLase與這些化學物質結合能力：運用螢光共振能量轉移法 (圖5-2A至D)、Hex與PatchDock等生物資訊分析工具來相互搭配研究其結合模式並求出其各 K_d 值 (圖5-2E至H, 表5-1至4) 與結合能 (表5-5)，探討其受質特異性；ALLase雖然

能結合這些受質類似物，但僅能催化 allantoin 的水解反應，並推論 ALLase在嘌呤代謝中，可能會協同與其他受質類似物的水解酵素產生反應。這些結果我們利用PyMOL程式來繪圖亦得知抑制劑與受質類似物與 ALLase結合之可能位置 (圖5-3A至E)，且這些化學物質目前皆可結合在 ALLase的活性區，影響其酵素活性：螯合劑能干擾胺基酸與金屬鍵結，致使ALLase難以水解allantoin；抑制劑產生受質競爭性，影響ALLase的活性表現；以及受質類似物雖能結合在活性區卻不能被水解釋出，致阻礙了生理受質的進入 (圖5-4A至L) (圖5-5A至E) (表5-6)。除了突變的分析，ConSurf Server的分析結果證明此Lys在ALLase家族中極為高度的保留 (圖4-5)，因此KCX (carboxylated Lys) 在演化上可能為一新型的胺基酸，用以得到更高活性的雙金屬中心，而不使用一般所認知的金屬結合胺基酸，如Cys、Asp、His與Glu (圖4-4A至C)。

斑馬魚可能的尿囊素水解酵素基因於pET21表現載體上，並經定序確認無誤，此酵素已可高溶解的大量表達於大腸桿菌，並已利用親和管柱層析法得到質純的蛋白質，然經質譜分析結果來看，並無明顯酵素活性，需再進一步探討其酵素活性性質，才得以與沙門氏菌的尿囊素水解酵素做生化特性比較。

由於ALLase從動物與細菌來源彼此有著很大的差異，且人類並不具有此酵素 (圖6-1, 圖6-2)，所以下一階段我們將持續利用這些結果來研究如何更有效的壓制此酵素活性，以作為研發出新型抗生素，期能選擇性阻斷細菌但不是人類的嘌呤代謝途徑。

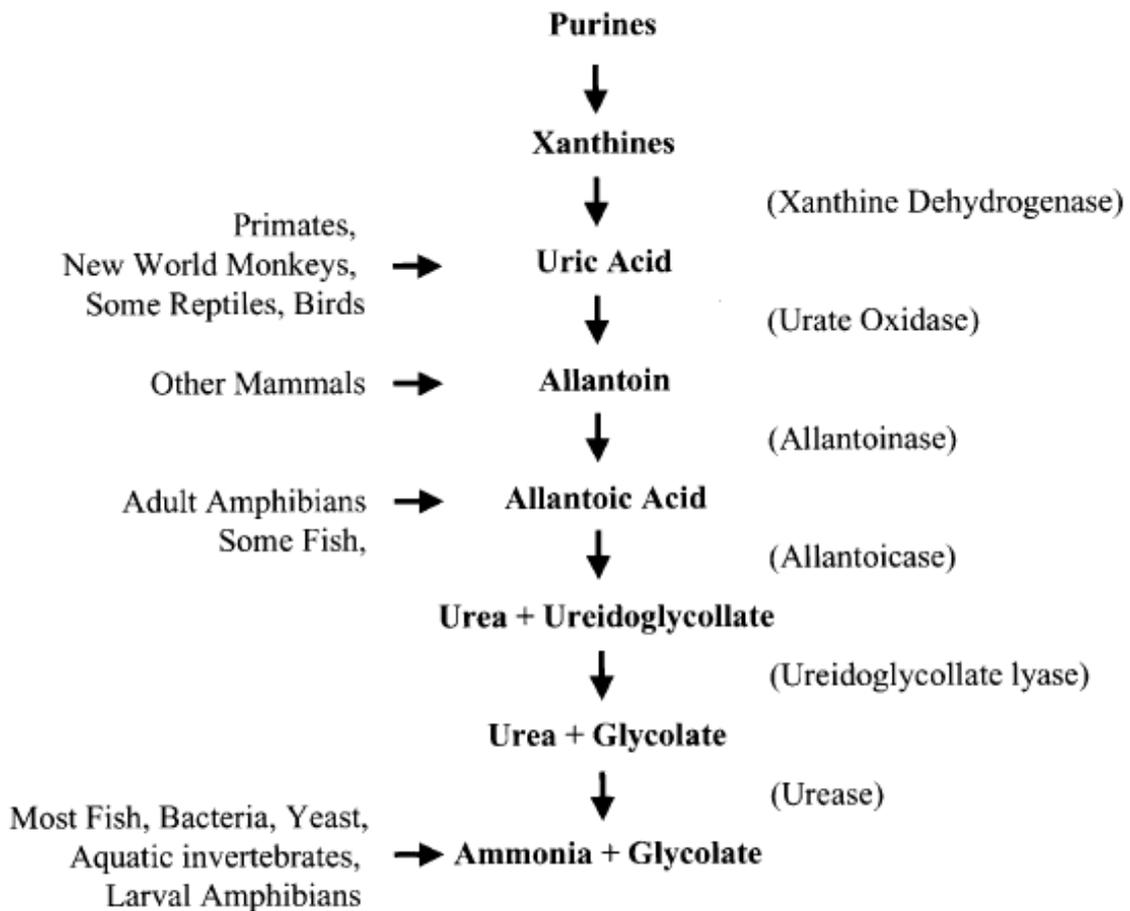


圖6-1：嘌呤代謝路徑，尿酸是嘌呤所產生的典型廢物，由嘌呤核苷酸先水解成核苷，再水解成游離鹼基，而後更進一步降解。經由去胺基作用嘌呤形成黃嘌呤，黃嘌呤再氧化則形成尿酸。在鳥類、爬蟲類、昆蟲、靈長類(包括人類)：尿酸；其他陸生動物：尿囊素 (Allantoin)；魚類：尿囊酸 (Allantoic acid)；微生物及某些兩棲類：乙醛酸 (Glyoxylate) 和尿素。

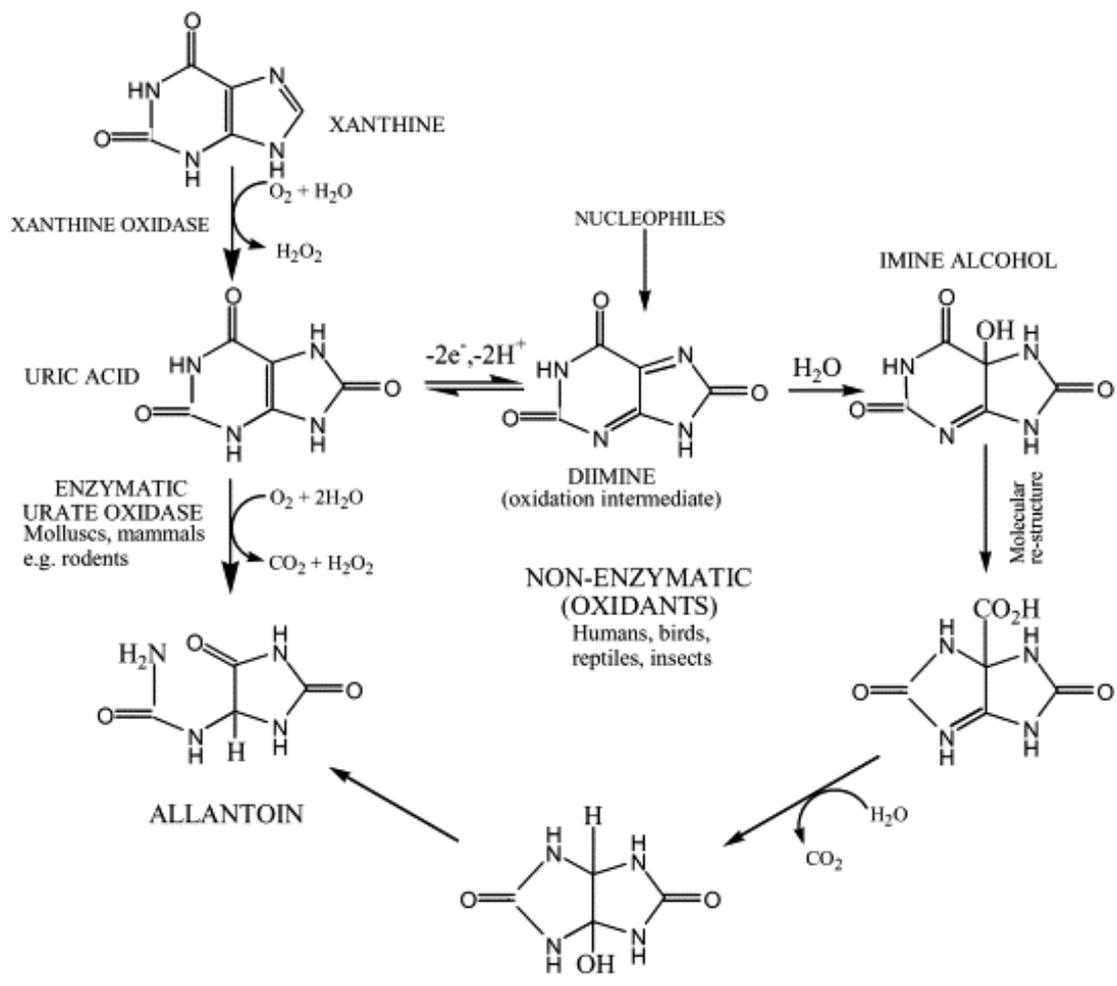


圖6-2：人類尿酸代謝路徑，人類的嘌呤代謝最終產物主要為尿酸，然經由Non-Enzymatic (oxidants) 路徑便可生成尿囊素 (allantoin)，而鳥類、爬蟲類以及昆蟲等皆有相似不經酵素降解的尿酸代謝路徑。

參考文獻

1. Zitka O, Ryvolova M, Hubalek J, Eckschlager T, Adam V, Kizek R (2012) From amino acids to proteins as targets for metal-based drugs, *Curr Drug Metab*, **13**, 306-20.
2. Ho, Y.Y., Huang, Y.H., Huang, C.Y.* (2012) Chemical rescue of the post-translationally carboxylated lysine mutant of allantoinase and dihydroorotase by metal ions and short-chain carboxylic acids, *Amino Acids*, DOI 10.1007/s00726-012-1451-3. (SCI)
3. Ho, Y.Y., Hsieh, H.C., Huang, C.Y. (2011) Biochemical characterization of allantoinase from *Escherichia coli* BL21. *Protein J.*, **30**, 384-394.
4. Schubert, K.R. (1981) Enzymes of purine biosynthesis and catabolism in *Glycine max*. I. Comparison of activities with N₂ fixation and composition of xylem exudate during nodule development. *Plant Physiol.*, **68**, 1115–1122.
5. Ramazzina, I., Cendron, L., Folli, C., Berni, R., Monteverdi, D., Zanotti, G., Percudani, R. (2008) Logical identification of an allantoinase analog (puuE) recruited from polysaccharide deacetylases. *J. Biol. Chem.* **22**, 23295-304.
6. Kim, K., Kim, M.I., Chung, J., Ahn, J.H., Rhee, S. (2009) Crystal structure of metal-dependent allantoinase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **17**, 1067-74.
7. Hayashi, S., Fujiwara, S., Noguchi, T. (1989) Degradation of uric acid in fish liver peroxisomes. Intraperoxisomal localization of hepatic allantoinase and purification of its peroxisomal membrane-bound form. *J. Biol. Chem.*, **264**, 3211-3215.
8. Raso, M.J., Pineda, M., Piedras, P. (2007) Tissue abundance and characterization of two purified proteins with allantoinase activity from French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Physiol. Plant*, **131**, 355-366.

9. Gaines, P.J., Tang, L., Wisnewski, N. (2004) Insect allantoinase: cDNA cloning, purification, and characterization of the native protein from the cat flea, *Ctenocephalides felis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **34**, 203-214.
10. Melvin F Simoyi, Elizabeth Falkenstein, Knox Van Dyke, Kenneth P Blemings, Hillar Klandorf (2003) Allantoin, the oxidation product of uric acid is present in chicken and turkey plasma . *CBP*,**135** ,325-335.