

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計劃編號: NSC90-2311-B-040-002

執行期限: 90 年 8 月 1 日~91 年 7 月 31 日

主持人: 簡宏堅 副教授 執行機關: 中山醫學大學微生物及免疫學科

一、中文摘要

在醫藥工業中，N-Carbamoyl-D-amino acid amidohydrolase(簡稱 D-NCAase)是一有價值的酵素，以光學選擇性的水解 N-Carbamoyl-D-amino acids 形成 D 型胺基酸。*Agrobacterium radiobacter* 的 D-NCAase 易受過氧化氫的氧化破壞。為了要研究在氧化抑制過程中 methionine 所扮演的角色，*A. radiobacter* D-NCAase 的 9 個 methionine 殘基，每一個 methionine 殘基，利用定點突變將它改變成 leucine 殘基，當中二種突變酵素(Met5Leu 和 Met31Leu)仍有相當的活性存在，其他七種突變酵素(Met73Leu, Met167Leu / Met169Leu, Met184Leu, Met220 Leu, Met239Leu, Met244Leu 和 Met239Leu / Met244Leu)被發現活性降低。在過氧化氫 H₂O₂ 存在下，三種突變酵素 (Met239Leu, Met244Leu 和 Met239Leu / Met244Leu) 它們易受影響的 Methioine 殘基已突變為 Leucine, 仍然擁有活性。而其他四種突變酵素比起原來酵素有較好的抗氧化作用。因此，將易受影響的 Methionine 殘基突變為 Leucine 可提升 D-NCAase 在氧化狀態的穩定度且擁有可信性的活性存在是一實用的技術。

關鍵詞：抗氧化性；

N-Carbamoyl-D-amino acid amidohydrolase；易受溶劑影響；定點突變；Methionine 氧化作用；*Agrobacterium*。

Abstract

N-Carbamoyl D-amino acid amidohydrolase (D-NCAase) that catalyzes the stereospecific hydrolysis of N-carbamoyl D-amino acids to their corresponding D-amino acids is valuable in pharmaceutical industry. *Agrobacterium radiobacter* D-NCAase is sensitive to oxidative damage by hydrogen peroxide. To investigate the role of methionine residues in oxidative inactivation, each of nine methionine residues in *A. radiobacter* D-NCAase was substituted with leucine respectively by site-directed mutagenesis. Except for two mutants (Met5Leu and Met31Leu) with similar activities, seven mutants (Met73Leu, Met167Leu / Met169Leu, Met184Leu, Met220Leu, Met239Leu, Met244Leu, and Met239Leu / Met244Leu) were found to have reduced activities. In the presence of H₂O₂, three mutants (Met239Leu, Met244Leu, and Met239Leu / Met244Leu) with substitution of highly solvent-accessible methionines by

leucines retained their activities. The other mutants were also considerably resistant to chemical oxidation than was the wild-type enzyme. Thus substitution of solvent-accessible methionine residues with leucine to enhance oxidative stability of D-NCAase is practical but might be with compromised activity.

Key words : Oxidative resistance; N-Carbamoyl D-amino acid amidohydrolase; Solvent-accessible; Site-directed mutagenesis; Methionine oxidation; *Agrobacterium*

二、計畫緣由與目的

D 型胺基酸是由 5-substituted hydantoin 經 D 型 hydantoinase(EC3.5.2.2) 水解而成 N-carbamoyl-D-amino acid 再一次水解而成(1,2,3), 它是用來合成抗生素, 胜賀爾蒙、農甜味料的原料。在工業上將 N-carbamoyl-D-amino acid 降解成 D 型胺基酸的方法稱 diazotation, 但它對 D 型胺基酸產量低而使用大量化學溶劑對環境造成非常大的衝擊(4), 取而代之的是酵素 N-carbamoyl-D-amino acid amidohydrolase (Nca) 水解流程, 它可解決上述的問題。

在探討 Nca 生產菌時, 研究團體發現 *Agrobacterium*、*Arthrobacter*、*Bacillus*、*Blastobacter*、*Comamonas*、*Flavobacterium* 和 *Pseudomonas* 對 Nca 的生產能力較強(5,6,7,8,9)。其中 *Pseudomonas* spp. 和 *Agrobacterium*

radiobacter 以及 *Bacillus circulans* 的 *nca* 基因均已被選殖及定序(10,11), 我們曾經將 *A. radiobacter* DH101 的 *nca* 基因選殖入 *E. coli* 中表現, 發現 Nca 是 homodimer, 單體分子量為 36 kDa, 此 Nca 酵素在 50°C 中 5h 後其活性盡失, 探討此 Nca 酵素對氧的穩定度, 發現在 10 μ M 的 H₂O₂ 存在下其活性完消失。它的胺基酸殘基 M220, M239 和 M244 可能是容易被氧化的位置, 而 H129, D209, D267 和 D277 可能與酵素的催化作用有關。我們也曾經將 *B. circulans* 的 *nca* 基因選殖入 *E. coli* 中表現, 發現 Mn²⁺、Co²⁺ 或 Ni²⁺ 離子存在時此 Nca 活性並不會提高, 而 Cu²⁺ 離子則會抑制酵素活性。此 Nca 對 H₂O₂ 的氧化作用有很差的抗性, 且不受 NH₄⁺ 的回饋抑制。酵素的最適反應 pH 及溫度分別為 7.0 及 60°C。在酵素中添加 500 μ M Mn²⁺ 離子, 於 50°C 中保溫 20 分鐘, 即失去活性。*B. circulans* 的 Nca 能將 N-Carbamoyl- β -alanine 轉換成 alanine 至於基質如 N-Carbamoyl-D-hydroxyphenyl glycine 沒有活性。

將 *A. radiobacter* D-NACase 用於醫藥工業生物轉換, 但在高溫下, 此酵素不穩定, 且容易受氧化變性(12-14), 因而限制了廣泛應用。有學者將 D-NCAase 進行突變, 以提高熱穩定度(12), 考慮到蛋白氧化, methionine 被發現氧化成 methionine sulfoxide(15), 結果失去構造完整性以及蛋白功能破壞(16-24), 不管蛋白遭受氧化的生理角色尚未清楚, 而 methionine sulfoxide reductase 能將氧化態轉換回原來的 methionine, 這告訴我們 methionine 可當一抗氧化劑, 調

控細胞的生理代謝(25)。因此，將 methionine 殘基突變呈不可氧化的殘基 leucine(26-28)，可保護醫藥工業有用的蛋白免於氧化抑制其活性，這種方式已有很多成功的例子(22,28)。本研究中，我們試著將 D-NCAase 中 methionine 殘基，分別突變為 leucine 殘基以降低對氧化的敏感性。每一種突變酵素和原來酵素比較它們的活性，同時結構上的變化，易受溶劑影響上以及抗氧化性都一併探討。

三、結果與討論

為了探討 methionine 殘基易受氧化而抑制酵素活性，將酵素的基因 *nca* 做突變，酵素基因 *nca* 有 0.9 kb *Bam*HI-*Hind*III 片段選殖形成 pQE-NCA 且進行定點突變。突變後的基因在選殖回 pQE30 並 *E. coli* JM109 中表現。利用金屬螯合管柱分離原生和突變酵素，發現到每一種突變酵素與原生酵素在分子量上並沒有差異。突變酵素的位子在 73，184，239 和 244，其活性有降低趨勢分別為原生酵素的 35%，43%，43% 和 22% 活性。但突變酵素 Met5 和 Met31 的活性沒有改變。

分離原生酵素用過氧化氫處理氧化，發現過氧化氫濃度為 0.1，0.25，0.4 和 0.5 mM 處理 15 分鐘，原生酵素活性分別降為 78%，60%，36% 和 20%。在 1 mM 過氧化氫處理原生酵素完全失去活性。對突變種酵素來說，仍然維持在 9 到 100% 的活性，特別突變種酵素 Met239 和 Met244，用 1 mM 過氧化氫處理發現完全抗氧化。

基於 D-NCAase 三度空間構造，Cys172 是活性中心，而 9 個 Methionine 中，兩個 Methionine 離活性中心比較

遠，Met5 應落於 four-layer structure 的另一端，Met31 是在 helix H1 的外圍，面向溶劑，而且 5 個 Methionines(Met5，Met31，Met73，Met239 和 Met244)易受溶劑影響，特別 Met239 和 Met244 為最。利用 leucine 個別取代 Met5 和 Met31 較不會影響酵素活性。至於抗氧化方面，發現 Met31Leu 經由 H₂O₂ 處理後失去大部份的活性，而在 1.0 mM 的 H₂O₂ 處理下，Met5Leu 酵素還有 53% 活性。因此，最有可能的解釋，Met5 有一個水分子接近(4.3Å)，最容易受氧化所破壞，因此，用 leucine 取代 Met5，此突變酵素提昇氧化後酵素穩定性。

兩個非易受溶劑影響的 methionine 應落在 exterior layer 接近於 AB 雙單元體介面，Met184 是在 H5 上，而 Met220 是在 H6，而且兩者的側鏈指向 β -sheet，比較接近活性丘。因而此兩種突變酵素失去活性，仍是此兩個 Methionine 維持構造與活性有關聯。而且發現此兩種突變酵素，在 H₂O₂ 處理下，有較高的抗氧化性，此仍是因 Met184 和 Met220 側鏈是非易受溶劑影響所致。有一個可能的假說，闡釋在原生酵素上的易受氧化的殘基，在突變後將變成較不受影響的殘基。對 Met73 來說，它是座落在 H2-H3 loop，它的側鏈接近 A2-H2 loop 上的 Glu47 是活性重要的位子，很清楚有一水分子正好在 Met73 的硫原子周圍(4.2Å 距離)，是一易受溶劑影響的位子。因此，突變酵素 Met73Leu 才顯現僅有 35% 的活性，回應接近 A2-H2 loop 的 Glu47 影響到活性。但是此突變酵素展現有非常高的抗氧化性，這也可說明將易受溶劑影響的殘基取代

後可增強抗氧化性。

4 個 Methionine 殘基正好排列於 sheet B，也就是活性中心 Cys172 附近；Met167 和 Met169 座落在 B2，Met239 是在 B4，Met244 是在 B5。Met239 和 Met244 座落於 sheet B 接近 B4-B5 短轉處正好在 B3-H6 大轉圈後圍繞在活性中心周圍。除了有單一胺基酸突變株，同時也有雙胺基酸 Met167Leu / Met169Leu 突變株。此一突變酵素活性較低，顯示這兩個 Methionine 殘基可能維持酵素活性立體構造有關。當增加 H₂O₂ 的濃度，Met167Leu / Met169Leu 突變酵素失去活性(從 100%降到 28%活性，當 H₂O₂ 濃度從 0 提升到 1.0 mM)。與 Met239 和 Met244 有關的突變酵素 (Met239Leu, Met244Leu 和 Met239Leu / Met244Leu)，它們的活性較低，顯示它們的角色可能維持酵素活性立體構造有關，與 Met167 和 Met169 類似。但有關抗氧化性方面，非常重大發現 Met239 和 Met244 有關的三種突變酵素完全抗氧化，這顯示 Met239 和 M244 是非常易受溶劑影響的 methionine 殘基，更易受 H₂O₂ 影響。

基於以上的結果，顯示易受溶劑影響的 methionine 殘基是酵素 D-NCAase 受化學氧化之最主要目標。因 Met239Leu, Met244Leu, and Met239Leu/Met244Leu 突變酵素不管在無 H₂O₂ 或有 H₂O₂ 存在下，其活性相當，與原生酵素性質相反，因此當在氧化狀態下，這兩個 methionine 示易受溶劑影響，也因而降低活性。在 1.0 mM 的 H₂O₂ 下，Met73Leu 突變酵素由於它的 Met239Leu 和 Met244 的位子被氧化而使活性降低~30%，相同情

況，Met5Leu 突變酵素由於它的 Met239 和 Met244 的位子被氧化後，接著 Met73 也被氧化而使活性降低~50%，Met167Leu/Met169Leu 突變酵素，它的 Met239, Met244, Met73 和 Met5 依序被氧化後，使活性降低~70%。Met31Leu 突變酵素它的 Met239, Met244, Met73, Met167 和 Met5 依序被氧化後比原生酵素降低~9%活性，從這樣的討論，了解到 D-NCAase 有依序漸進的氧化程序影響活性：Met239, Met244, Met73, Met5 和 Met167 到 Met31。另一方面將 Methionine 突變成 leucine 可能影響到蛋白穩定和結構，因而降低酵素活性如突變酵素 Met167Leu/Met169Leu, Met184, Met220, Met239, Met244, Met239Leu/Met244Leu。而 Met167Leu/Met169Leu 突變酵素雖失去~50%活性，但明顯提昇抗氧化性。因此單純將易受溶劑影響的 methionine 突變成 Leucine，雖稍微減少其活性，但明顯增加抗氧化能力 (23,29) 這種突變可應用於體內當抗氧化劑(25)。未來的挑戰是遺傳改造出即抗氧化又高活性的酵素。

四、計畫成果自評

本年度計畫的主要目標在於 *Agrobacterium radiobacter* D-NCAase 的 methionine 改造以分析酵素性質和抗氧化性。目前已完成進度，且其酵素性質及抗氧化性極佳，適合學術研究與工業上應用。

五、參考文獻

1. Syldatk, C., A. Laufer, R. Muller, and H. Hoke. 1990. Production of optically pure D- and L-amino acids by bioconversion of D, L-5-monosubstituted hydantoin derivatives. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 4:30-75.
2. 工業技術研究院化學工業研究所提供.
3. LaPointe, G., S. Viau, D. Leblanc, N. Robert, and A. Morin. 1994. Cloning, sequencing, expression in *Escherichia coli* of the D-hydantoinase gene from *Pseudomonas putida* and distribution of homologous genes in other microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:888-895.
4. Shimizu, S., H. Shimada, S. Takahashi, T. Ohashi, Y. Tani and H. Yamada. 1980. Synthesis of N-carbamyl-D-2-thienylglycine and D-2-thienylglycine by microbial hydantoinase. *Agric. Biol. Chem.* 44:2233-2234.
5. Yokozeki, K., Y. Hirose, and K. Kubota. 1987. Mechanism of asymmetric production of L-aromatic amino acids from the corresponding hydantoins by *Flavobacterium* sp. *Agric. Biol. Chem.* 51:737-746.
6. Moller, A., C. Syldatk, M. Schulze, and F. Wagner. 1988. Stereo- and substrate-specificity of a D-hydantoinase and a D-N-carbamyl-amino acid aminohydrolase of *Arthrobacter crystallopoietes* AM2. *Enzyme Microb. Technol.* 10:618-625.
7. Runser, S., and E. Ohleyer. 1990. Properties of the hydantoinase from *Agrobacterium* sp. IP I-671. *Biotechnol. Lett.* 12:259-264.
8. Morin, A., W. Hummel, and M. R. Kula. 1986. Production of hydantoinase from *Pseudomonas fluorescens* strain DSM 84. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25:91-96.
9. Mukohara, Y., T. Ishikawa, K. Watabe, and H. Nakamura. 1994. A thermostable hydantoinase of *Bacillus stearothermophilus* NS1122A: cloning, sequencing, and high expression of the enzyme gene, and some properties of the expressed enzyme. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58:1621-1626.
10. Grifantini, R. 1996. *Agrobacterium radiobacter* D-hydantoinase gene, and D-N-alpha-carbamoylase gene. GenBank accession number X 91070.
11. Watabe, k., T. Ishikawa, Y. Mukohara, and H. Nakamura. 1992. Cloning

- and sequencing of the genes involved in the conversion of 5-substituted hydantoins to the corresponding L-amino acids from the native plasmid *Pseudomonas* sp. strain NS671. *J. Bacteriol.* 174:962-969.
- 12 Y. Ikenaka, H. Nanba, K. Yajimaa, Y. Yamada, M. Takano, S. Takahashi, Increase in thermostability of *N*-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase on amino acid substitutions, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62 (1998) 1668-1671.
- 13 Y. Ikenaka, H. Nanba, K. Yajima, Y. Yamada, M. Takano, S. Takahashi, Relationship between an increase in thermostability and amino acid substitutions in *N*-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62 (1998) 1672-1675.
- 14 R. Grifantini, C. Pratesi, G. Galli, G. Grandi, Topological mapping of the cysteine residues of *N*-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase and their role in enzymatic activity, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 9326-9331.
- 15 R.G. Keck, The use of *t*-butyl hydroperoxide as a probe for methionine oxidation in proteins, *Anal. Biochem.* 236 (1996) 52-62.
- 16 M.A. Lischwe, M.T. Sung, Use of *N*-chlorosuccinimide/urea for the selective cleavage of tryptophanyl peptide bonds in proteins, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 4976-4980.
- 17 C.B. Glaser, C.H. Li, Reaction of bovine growth hormone with hydrogen peroxide, *Biochemistry* 13 (1974) 1044-1047.
- 18 S.T. Chu, C.C. Chu, C.C. Tseng, Y.H. Chen, Met-8 of the β_1 -bungarotoxin phospholipase A₂ subunit is essential for the phospholipase A₂-independent neurotoxic effect, *Biochem. J.* 295 (1993) 713-718.
- 19 L.C. Teh, L.J. Murphy, N.L. Hug, A.S. Surus, H.G. Friesen, L. Lararus, G.E. Chapman, Methionine oxidation in human growth hormone and human chorionic somatomammotropin, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 6472-6477.
- 20 N. Brot, H. Weissbach, Biochemistry of methionine sulfoxide residues in proteins, *Biofactors* 3 (1991) 91-96.
- 21 W. Vogt, Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal, *Free Rad. Biol. Med.* 18 (1995) 93-105.
- 22 Y.H. Kim, A.H. Berry, D.S. Spencer, W.E. Stites, Comparing the effect on protein stability of methionine

- oxidation versus mutagenesis: steps toward engineering oxidative resistance in proteins, *Protein Eng.* 14 (2001) 343-347.
- 23 H.S. Lu, P.R. Fausset, L.O. Narhi, T. Horan, K. Shinagawa, G. Shimamoto, T.C. Boone, Chemical modification and site-directed mutagenesis of methionine residues in recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effect on stability and biological activity, *Arch Biochem Biophys.* 362 (1999) 1-11.
- 24 N. Gustavsson, B.P. Kokke, B. Anzelius, W.C. Boelens, C. Sundby, Substitution of conserved methionines by leucines in chloroplast small heat shock protein results in loss of redox-response but retained chaperone-like activity, *Protein Sci.* 10 (2001) 1785-1793.
- 25 R.L. Levine, J. Moskovitz, E.R. Stadtman, Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation, *IUBMB Life.* 50 (2000) 301-307.
- 26 H.S. Duewel, E. Daub, V. Robinson, J.F. Honek, Elucidation of solvent exposure, side-chain reactivity, and steric demands of the trifluoromethionine residue in a recombinant protein, *Biochemistry.* 40 (2001) 13167-13176.
- 27 B.C. Shenoy, D. Samols, G.K. Kumar, The conserved methionines of the 1.3S biotinyl subunit of transcarboxylase: effect of mutations on conformation and activity, *Arch Biochem Biophys.* 304 (1993) 359-366.
- 28 S.S. Ju, L.L. Lin, H.R. Chien, W.H. Hsu, Substitution of the critical methionine residues in *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase with leucine enhances its resistance to hydrogen peroxide, *FEMS Microbiol. Lett.* 186 (2000) 215-219.
- 29 H. Sun, J. Gao, D.A. Ferrington, H. Biesiada, T.D. Williams, T.C. Squier, Repair of oxidized calmodulin by methionine sulfoxide reductase restores ability to activate the plasma membrane Ca-ATPase, *Biochemistry.* 38 (1999) 105-12.