

大肠杆菌 AS1.357 L-天门冬酰胺酶的选择性化学修饰*

钱世钧 郝凤兮 孟广震

(中国科学院微生物研究所, 北京)

用九种化学修饰剂研究了大肠杆菌 AS1.357 L-天门冬酰胺酶分子中的五种不同氨基酸侧链基团与催化活性的关系。结果说明, 该酶活力与硫氢基完全无关; 与色氨酸、精氨酸和组氨酸亦无直接联系; 而酪氨酸残基和羧基的修饰引起酶活力急剧下降。其中酪氨酸残基已被证实是该酶活力的必需基团, 处于该酶分子的活性部位。

关键词 L-天门冬酰胺酶; 化学修饰

蛋白质化学修饰是寻找酶活性中心, 探明哪些基团是酶活力所必需的一个有效方法。利用这个方法, 已经取得了大量关于酶的结构与功能关系的信息。为测定大肠杆菌 AS1.357 L-天门冬酰胺酶活力所必需的基团, 我们用一系列化学修饰剂修饰了 L-天门冬酰胺酶的各种氨基酸侧链基团。本文报告这一研究的主要结果。

材料和方法

(一) 化学试剂

大肠杆菌 AS1.357 L-天门冬酰胺酶由天津生化制药厂提供, 比活力为 150u/mg 蛋白质。

PCMB 为 Hopkin & Williams 公司, DTNB 为 Merck 公司, DEP 为 Aldrich 公司, 乙二醛为 Carl Roth 公司, N-AI 为 Serva 公司, EDC 为日本同仁化学研究所, NBSF 为 Pierce 公司的产品。NEM, H_2O_2 , 甘氨酸乙酯及其他试剂都是国产。

(二) 酶活力测定方法

用作者以前报道的方法测定^[1]。

(三) 化学修饰一般方法

酶制剂溶于水, 流水透析, 再对合适的缓冲液透析, 各种修饰剂配成所需浓度, 在一定温度下与酶作用给定时间, 然后分析酶的残余活力。

先后用三种不同的巯基试剂对该酶进行化学修饰, 反应条件如下:

将 PCMB^[2] 溶于 pH 5.0, 0.2M 乙酸缓冲液, 在 30℃ 与酶作用 1h。

将 DTNB^[3] 溶于 pH 7.5, 0.1M 磷酸缓冲液, 在室温与酶作用 3min。

将 NEM^[4] 先用少量丙酮溶解, 再加入 pH 7.5, 0.1M 磷酸缓冲液, 在 30℃ 与酶作用 1h。

本文于 1984 年 2 月 14 日收到。

* 本文主要内容曾于 1983 年第二次酶的结构与功能讨论会上宣读。生物物理所李小洁同志协助超离心分析, 美国 Dr. J. Tang 赠 NBSF 试剂在此一并致谢。

* 本文采用的缩写名词:

PCMB: P-Chloromercuribenzoate

对-氯汞苯甲酸;

DTNB: 2,2'-Dinitro-5,5'-dithio-dibenzoic acid

二硝基二硫基二苯甲酸;

NEM: N-ethylmaleimide, (Ellman's reagent)

N-乙基顺丁烯二酰亚胺;

Koshland reagent; 2-Hydroxy-5-nitrobenzyl bromide

2-羟基-5-硝基溴苯;

DEP: Diethyl pyrocarbonate

二乙基焦碳酸盐;

EDC: 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimide

1-乙基-3-(3-二甲氨基-丙基)-碳二亚胺;

N-AI: N-Acetylimidazole

N-乙酰咪唑;

NBSF: P-Nitrobenzenesulfonyl fluoride

对硝基苯基磺酰氟

结果和讨论

(一) 巯基的化学修饰

这三种试剂对酶的作用结果见表 1。三种巯基专一试剂对酶活力基本上没有影响,这显然可以认为,巯基不是酶活力的必需基团。Nishimura 等^[5]曾报告,大肠杆菌 HAP L-天门冬酰胺酶分子中没有可资同 PCMB 和 NEM 反应的半胱氨酸。另外,Greenquist 等^[6]也报告,大肠杆菌 B 的 L-天门冬酰胺酶分子有八个半胱氨酸残基,但它们是通过四个链内二硫键以四个胱氨酸的形式存在。这些报道与我们的结果是一致的。即大肠杆菌 L-天门冬酰胺酶不是巯基酶。

(二) 色氨酸、精氨酸和组氨酸的化学修饰

Koshland 试剂^[7]是色氨酸的专一性修饰试剂。先将该试剂用丙酮溶解,0.05ml 的 Koshland 溶液与 0.95 ml 酶液 (pH5.0, 0.05 M 乙酸缓冲液) 在 30℃, 反应 15min, 作用过程中用稀碱保持 pH5.0, 反应完,立即流水透析,测酶活力。酶的残余活力为 83% (表 1)。

过氧化氢和乙二醛分别是色氨酸和精氨酸的专一性修饰试剂。按 Nishimura^[5]

方法,过氧化氢的二氧六环液在 pH8.0, 0.02 M 磷酸缓冲液系统,同酶在室温作用 3h,酶活力保持 79% (表 1),而乙二醛液与酶在 pH8.5, 0.5 M 硼酸缓冲液里室温作用 3h,酶活力还有 84% (表 1)。

将 DEP^[8]用无水乙醇稀释,0.1 ml DEP 液与 0.9 ml 酶液 (含 pH7.2 0.05 M 磷酸缓冲液) 在 25℃ 作用 3min, 稀释后测酶活力,残余酶活力达 84% (表 1)。在这个反应条件下,DEP 主要是同组氨酸的咪唑基作用。

上面这些结果表明,在用 Koshland 试剂,过氧化氢、乙二醛和 DEP 对酶的修饰情况下,大部分酶活力仍保存,因此相对应的主要被修饰基团,色氨酸、精氨酸和组氨酸残基都不是酶活力的必需基团,而在修饰过程中所引起的酶的部份钝化,可能间接地由酶分子构象的改变所致。

(三) 酪氨酸残基的化学修饰

前文^[9]已初步说明,酰化试剂 N-AI 对酶作用十分明显,酪氨酸残基是酶活性所必需的。本文将进一步用实验证明之。

我们已经证明,大肠杆菌 L-天门冬酰

表 1 一些蛋白质侧链修饰试剂对 L-天门冬酰胺酶活力的影响

Table 1 The effects of some modifying reagents of protein side-chain on L-asparaginase activity

试 剂 Reagents	终浓度 Final concentration 试剂 reagents 酶 enzyme (M)	残余活力 Residual activity (%)
PCMB	2×10^{-3} 1×10^{-3}	96
DTNB	1×10^{-3} 2×10^{-3}	99
NEM	1×10^{-3} 2×10^{-3}	100
Koshland 试 剂 Koshland reagent	1×10^{-3} 2×10^{-3}	83
H ₂ O ₂	2×10^{-2} 1.5×10^{-3}	79
DEP	1×10^{-2} 7×10^{-3}	84
乙二醛 Glyoxal	1×10^{-1} 8×10^{-6}	84

胺酶分子的亚基没有活力^[10]。而经 N-AI 作用过的酶与自然酶的沉降系数几乎一样,分别为 7.34S 和 7.4S (见图 1), 所以这排除了酶分子经 N-AI 作用后解离成亚基的可能性。

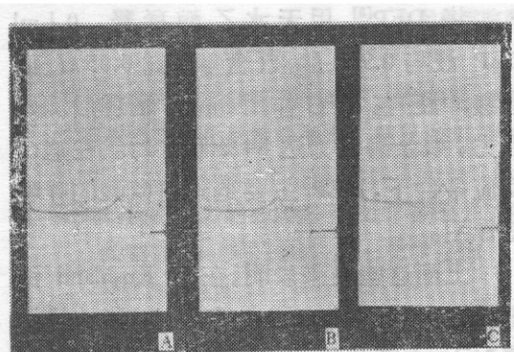


图 1 天然酶和修饰酶的分析超离心图谱

Fig. 1 Analytic ultracentrifuge patterns of native and modified L-asparaginase.

(酶 enzyme: 3mg/ml 55000 rpm,)

- A. 自然酶
Native enzyme, 7.4S
B. 被 N-AI 修饰的酶
Modified enzyme by N-AI 7.34S
C. 被 EDC 修饰的酶
Modified enzyme by EDC 7.47S

表 2 的结果说明, N-AI 作用过的 L-天门冬酰胺酶经羟胺处理, 酶活力基本得到恢复。这可以认为, 活性的恢复是由于被 N-AI 修饰的基团恢复到原来状态之故。然而, N-AI 与酶作用的可能基团是酪氨酸和氨基, 但二者比较, 它对酪氨酸残基的作用有更多的选择性^[11], 仅当酪氨酸残基被广泛修饰情况下, 才可期望某些氨基被乙酰化。以前的数据表明^[9], 在较低的 N-AI/酶克分子比值情况下, 就已看到酶活力大幅度下降, 这只能被解释为酪氨酸残基被修饰的结果。为了证明这点, 我们又用了另一种修饰剂 NBSF。

NBSF 是一种最近被推荐的对酪氨酸更专一修饰剂。按 Liao 等^[12]方法, 将 NBSF 溶于异丙醇, 在 pH8.6 0.1M tris-HCl 缓冲液系统里, 25℃ 与酶作用 1h。

8mM NBSF 就使 L-天门冬酰胺酶全部失活(见图 2)。NBSF 与酶反应条件温和, 产物是 N-磺酰化的酪氨酸, Liao 用 NBSF 修饰牛胰脱氧核糖核酸酶, 通过很多实验发现唯一被修饰的残基是酪氨酸, 可见, NBSF 是一个非常专一的酪氨酸残基修饰剂。本工作首先将 NBSF 用于 L-天门冬酰胺酶化学修饰的研究。结果为以下结论提供了一个强有力的佐证: 即酪氨酸残基是酶活力的必需基团。

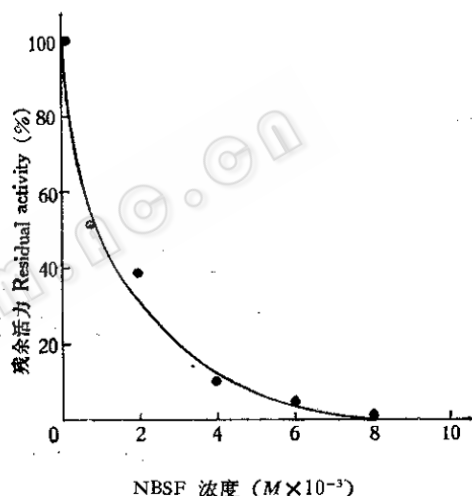


图 2 NBSF 对 L-天门冬酰胺酶的修饰

Fig. 2 Modification of L-asparaginase by NBSF

底物保护作用是研究酶活力必需基团常用而有效的方法。本工作结果显示底物 L-天门冬酰胺在 N-AI 对酶修饰过程中的保护作用非常明显(图 3)。当存在 40mM L-天门冬酰胺时, 酶的残余活力达 80%。显而易见, 某些酪氨酸残基势必位于酶的活性中心部位, 这一结果与前文^[9]报道的结论完全一致。

(四) 羧基的化学修饰

水溶性碳化二亚胺是在酶的羧基修饰中用得较多的一种试剂。将 0.5ml 酶液与 0.1ml 各种浓度的水溶性碳化二亚胺试剂 EDC^[13], 0.1ml 亲核试剂 1M 甘氨酸乙酯

表 2 L-天门冬酰胺酶的乙酰化和脱乙酰化作用

Table 2 Acetylation and deacetylation of L-asparaginase

最终浓度 Final concentration (M)		残余活力 Residual activity (%)	
N-AI	酶 Enzyme	乙酰化酶 Acetylated enzyme	脱乙酰化酶 Deacetylated enzyme
0	1×10^{-5}	100	100
5×10^{-3}	1×10^{-5}	3.6	93.9
2×10^{-3}	1×10^{-5}	10.7	93.9
1×10^{-3}	1×10^{-5}	35.7	98.0

脱乙酰条件：乙酰化酶在 30℃ 用 1M 羟胺 (pH7.5) 处理 30 分,然后透析、分析。
Deacetylation Condition: Acetylated enzyme was treated by 1M hydroxylamine (pH7.5) at 30℃ for 30 min. After deacetylation, sample was dialyzed and analyzed.

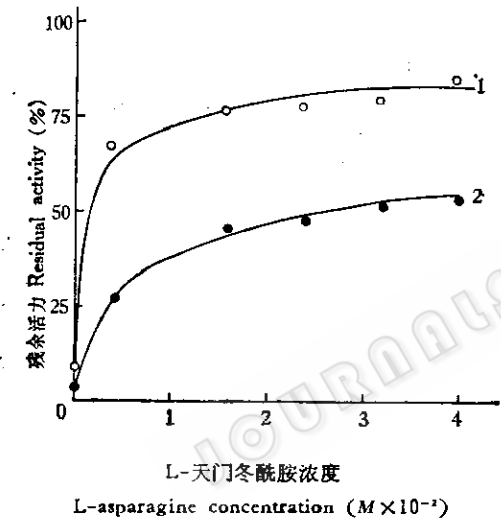


图 3 在 N-AI 对 L-天门冬酰胺酶修饰中不同底物浓度对酶活力的保护作用

Fig. 3 Protection of L-asparaginase activity from N-acetylimidazole modification by different concentration of substrate

N-AI 对酶克分子比 Molar ratio of N-AI to enzyme: 1.500; 2.1000

以及 0.3ml 水混合,在 30℃ 作用 2h,反应过程中,用 0.1N HCl 保持反应 pH5.0。反应完成后,一部分用于测酶活力,另一部分加等体积 1M 羟胺 (pH7.5),30℃,作用 5h,然后透析过夜再测酶活力。结果表明(表 3),50mM EDC 致使酶全部失活。

水溶性碳化二亚胺是一种对羧基比较专一的试剂,在一定条件下,也有可能与硫

基及酪氨酸残基作用,前已提到,巯基不是酶活力所必需的,所以毋需再考虑,而酪氨酸残基却是酶活力所必需的。Carraway 和 Koshland^[14] 曾提到,水溶性碳化二亚胺与酪氨酸作用的产物 O-苯基异脲或 N-苯基脲经 1M 羟胺 (pH7.5) 处理以后,它们能回复到酪氨酸原来状态。而经 EDC 作用过的 L-天门冬酰胺酶用羟胺处理以后,酶活力基本不变(见表 3)。这说明,酶的失活是由于酶的羧基被修饰。而酪氨酸残基没有参与同 EDC 作用,或与 EDC 作用的那些酪氨酸残基和酶活力无关。

经 EDC 作用的酶的沉降系数为 7.47S (见图 1),与自然酶的沉降系数 (7.4S) 没有明显差异。同样,这也排除了酶分子经 EDC 作用后分解成亚基的可能性。

根据上述结果推测,酶分子的羧基可能与酶的催化活力有关。程玉华等*曾用另一羧基修饰剂 Woodward's 试剂修饰 L-天门冬酰胺酶也得到相似结果。但考虑到羧基在该酶蛋白分子中广泛存在^[15],加之羧基能形成氢键和离子键,这在维持蛋白质分子的空间结构中起重要作用,因此羧基的修饰反应有可能引起酶分子构象的重

* 个人通讯。

表 3 EDC 对 L-天门冬酰胺酶活力的影响

Table 3 The effect of EDC on L-asparaginase activity

浓度 Concentration (mM)		残余活力 Residual activity (%)	
试剂 Reagent	酶 Enzyme	未经羟胺处理 Without hydroxylamine treatment	用羟胺处理 With hydroxylamine treatment
100	2×10^{-2}	0	0
50	2×10^{-2}	0	0
10	2×10^{-2}	4.7	3.4

大改变,从而间接影响酶的活力。要彻底搞清羧基修饰引起活力丢失的本质,还有待进一步工作。

参 考 文 献

- [1] 邱秀宝等,微生物学报,13(1): 59—62, 1973.
- [2] Means, G. E. and Feeney, R. E.: Chemical Modification of Proteins., San Francisco, Holden-Day Inc., 1971, p218.
- [3] Leskovac, V. and Pavkov-Pericin, D.: Biochem. J., 145: 581, 1975.
- [4] Colman, R. F. and Chu, R.: J. Biol. Chem., 245(3): 601, 1970.
- [5] Nishimura, Y., et al.: Biochim. Biophys. Acta., 227: 171, 1971.
- [6] Greenquist, A. C., et al.: Arch. Biochem. Biophys., 152(1): 280, 1972.
- [7] Means, G. E. and Feeney, R. E.: Chemical

Modification of Proteins., San Francisco, Holden-Day Inc., 1971, p 228.

- [8] Miles, E. W.: Methods in Enzymology. (Hirs, C. H. W and S. N Timasheff ed.) vol. 47, Academic press, New York and London, 1977, p431.
- [9] He Zhongxiao, et al.: Scientia Sinica, 24 (9): 1285 1981.
- [10] 孟广震等: 生物化学与生物物理学报, 16(6): 595, 1984.
- [11] Means, G. E. and Feeney, R. E.: Chemical Modification of Proteins., San Francisco, Holden-Day Inc., 1971, p72.
- [12] Liao, T. H., et al.: J. Biol. Chem., 257: 5637, 1982.
- [13] Horinish, H., et al.: J. Biochem. (Tokyo), 63(1): 41, 1968.
- [14] Carraway, K. L. and Koshland, D. E.: Biochim. Biophys. Acta., 160: 272, 1968.
- [15] Meng Guangzhen: Kexue Tongbao, 28(4): 549, 1983.

SELECTIVE CHEMICAL MODIFICATION OF L-ASPARAGINASE FROM *E. COLI* AS 1.357

Qian Shijun Hao Fengxi Meng Guangzhen

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The relationship between catalytic activity and 5 different amino acid side chain groups of L-asparaginase from *E. coli* AS 1.357 were studied by 9 chemical modified reagents. The results showed that, sulfhydryl group had no relation to enzyme activity at all, there were no direct relationships between the enzyme activity and tryptophan, arginine and histidine residues. But, the modification of

tyrosyl residues and carboxyl groups caused remarkable decrease in the enzyme activity. It is proved that tyrosyl residues are essential for enzyme activity and locate at the active site of the enzyme molecule.

Key words

L-Asparaginase; chemical modification