

专论与综述

微生物来源的尿酸氧化酶的研究进展及应用前景

陈志禹^{1,2} 何秀萍¹ 张博润^{1*}

(中国科学院微生物研究所, 能源与工业微生物中心 北京 100101) (中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要 尿酸氧化酶是一种重要的医药用酶, 它催化嘌呤代谢途径中的尿酸氧化生成尿囊素和过氧化氢, 因而被广泛用于治疗痛风, 检测血液尿酸浓度, 预防和治疗由于肿瘤化学治疗引起的高尿酸血症。综述了尿酸氧化酶的来源、酶学性质、基因克隆与表达及其用途, 并对其在应用中存在的问题和前景作了展望。

关键词 尿酸氧化酶, 尿酸, 酶学性质, 基因工程

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)06-1205-04

Research Progress on the Microbial Urate Oxidase

CHEN Zhi-Yu^{1,2} HE Xiu-Ping¹ ZHANG Bo-Run^{1*}

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

(Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract Urate oxidase belonging to the purine degradation pathway, catalyzes the oxidation of uric acid to allantoin. It's useful for enzymatic determination of urate in clinical analysis. It can also be used as protein drug for treatment of gout, hyperuricemia and tumor lysis syndrome (TLS).

The source, enzyme property, genetic engineering and application of uricase were reviewed in this paper.

Key words Urate oxidase, Uric acid, Enzyme properties, Genetic engineering

尿酸氧化酶(Urate oxidase, Uricase, EC. 1.7.3.3)是生物体内嘌呤降解代谢途径中的一种酶, 能催化尿酸氧化为尿囊素和过氧化氢(图1)^[1], 尿囊素是除人和猿类以外其它哺乳动物嘌呤代谢的排泄物。许多物种中均发现有尿酸氧化酶存在, 但在高等哺乳动物(猿和人类)体内却缺乏有生物活性的尿酸氧化酶, 而以尿酸作为嘌呤代谢的终产物^[2]。尿

酸及其盐类在血液中溶解度很低, 如果体内嘌呤代谢紊乱, 产生过量尿酸, 或者尿酸排泄受阻, 血液中尿酸浓度增高, 形成高尿酸症, 长期尿酸过高就引起痛风^[3]。在临床上, 尿酸氧化酶被用于痛风, 高尿酸血症和肿瘤溶解综合征的治疗^[4-7], 因此尿酸氧化酶是一种重要的医药用酶。

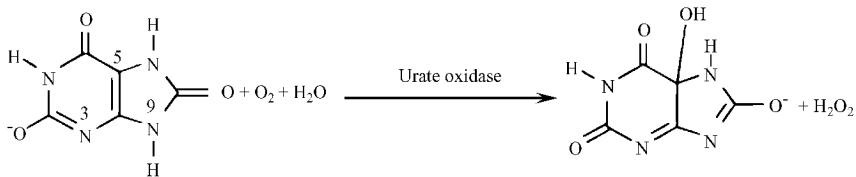


图1 尿酸氧化酶在嘌呤代谢途径中催化的反应

* 通讯作者 Tel: 010-64807427, E-mail: zhangbr@im.ac.cn

收稿日期: 2007-02-08, 修回日期: 2007-04-20

1 尿酸氧化酶的来源及其酶学性质

尿酸氧化酶在自然界广泛存在, Schittenhem 首先在牛的肾脏中发现尿酸氧化酶, 此后多种来源的尿酸氧化酶陆续被发现, 并对其物理化学性质进行

了广泛的研究。微生物是尿酸氧化酶的重要来源, 目前已有细菌、酵母菌和丝状真菌等来源的尿酸氧化酶被分离, 并对酶的物理化学性质进行了研究(表 1)。

表 1 不同微生物来源尿酸氧化酶的酶学性质

菌株来源	单体分子量(kD)	等电点	最适 pH	最适温度(℃)	热稳定性(℃)
<i>Aspergillus flavus</i>	34	7.5	8.0	30~37	
<i>Candida utilis</i>	34	5.6	8.5	30	55
<i>Bacillus</i> sp. TB-90	38	4.75	8.0~8.5		50
<i>Arthrobacter globiformis</i>	33	4.96	7.0~7.5		60
<i>Neurospora crassa</i>	33		8.8		
Genus <i>Microbacterium</i>	34		8.5	37	70
<i>Bacillus fastidiosus</i>	36	4.3	9.5	30~35	60
	39				
<i>Enterobacter cloacae</i>	27	4.6	9.5	40	60

各种来源的尿酸氧化酶都存在于过氧化物酶体(peroxisome)中, 微生物来源的酶均为胞内酶, Liu J 等在细胞超声波破碎后, 通过硫酸铵沉淀、DEAE-Cellulose G200 离子交换层析、Sephadex G200 凝胶层析, 分离纯化了 *C. utilis* 来源的尿酸氧化酶, 回收率为 14.77%^[8]。部分真核生物来源的尿酸氧化酶含有铜离子结合区域, 原核来源的酶则没有金属离子结合区域, 多种金属离子对酶有抑制作用, 各种金属离子对不同来源的尿酸氧化酶的抑制作用差异较大^[9]。晶体结构分析表明, 来自 *A. flavus* 和大豆根瘤的尿酸氧化酶活性部位不含过渡金属离子或有机辅助因子, 活性部位也没有被修饰的氨基酸残基^[1]。多数尿酸氧化酶为同源四聚体, X-射线衍射表明四聚体由两个二聚体组成, 形成一个孔道状的蛋白, 单体分子量为 34kD 左右, 不同来源的酶大小稍有差异^[10]。但是来自 *B. fastidiosus* 的尿酸氧化酶虽然也是四聚体, 但是活性蛋白是由两种不同的亚基(36kD, 39kD)组成的^[11]。

尿酸氧化酶是一种以分子氧作为受体的氧化酶, 绝大多数以氧气为底物的酶需要辅因子来介导和氧的化学反应, 尿酸氧化酶却不需要任何辅因子参与催化反应, 尿酸双阴离子的形成被认为是氧化反应的关键步骤^[1]。

2 尿酸氧化酶的应用

2.1 尿酸氧化酶在临床检测上的应用

血清中高浓度的尿酸是诊断痛风和高尿酸血症的重要指标。迄今为止已发展出多种测定尿酸的方法, 其中依赖于尿酸氧化酶催化反应的酶分析法因特异性高, 反应灵敏而成为常用的方法^[12]。

2.2 尿酸氧化酶在临床治疗上的应用

2.2.1 在痛风治疗上的应用 痛风是长期嘌呤代谢障碍, 血尿酸浓度增高引起组织损伤的一组异质性疾病, 调查表明, 0.26%~0.84%的成年人患有痛风, 随着人们生活水平的不断提高, 饮食中富含嘌呤的成分增加, 痛风的发病率有逐渐上升的趋势^[13]。治疗痛风常用别嘌呤醇(Allopurinol), 这是黄嘌呤氧化酶的竞争性抑制剂, 在黄嘌呤氧化酶活性被抑制后, 嘌呤分解的产物以黄嘌呤和次黄嘌呤排出, 但会增加肾脏排泄尿酸前体的负荷。与次黄嘌呤不同, 黄嘌呤在尿中比尿酸难溶, 有时别嘌呤醇治疗的病人也可出现黄嘌呤肾病和结石。此外, 对于病人体内存留的尿酸的排泄, 使用别嘌呤醇治疗无效。直接注射尿酸氧化酶能更快地降低血液中的尿酸浓度, 且使肾脏和关节中的尿酸沉淀更快地被吸收, 可用于痛风石症的长期治疗^[4]。

2.2.2 用于高尿酸血症和肿瘤溶解综合征的治疗;

高尿酸血症(Hyperuricemia)是白血病和淋巴瘤及其治疗的一种常见并发症。肿瘤细胞的增生导致核酸的分解增加,进而增加嘌呤代谢,导致血液尿酸浓度的增高,癌症的积极治疗可引起细胞溶解增多和嘌呤代谢物的释放,表现为严重高尿酸血症、高磷酸盐血症、高钾血症、高钙血症和急性肾衰,引起肿瘤溶解综合征(TLS)。作为高尿酸血症的结果,当尿中的尿酸达到过饱和,肾小管和远端收集系统出现尿酸结晶就引起肾功能不全。Goldman等进行的公开标签随机多中心的尿酸氧化酶和别嘌呤醇用于高尿酸血症和肿瘤溶解综合征治疗的对照研究表明,使用尿酸氧化酶治疗的病人,血液中尿酸水平下降较快,并在整个诱导化疗期间,始终维持在较低水平^[7]。

3 尿酸氧化酶基因的克隆和表达

已有多种来源的尿酸氧化酶基因被克隆。Nguyen等首先报道了大豆根瘤特有的尿酸氧化酶(尿酸氧化酶II)亚基Nodulin-35蛋白的基因克隆。核酸结构分析表明,完整的基因包括大约5000个碱

基,编码区被七个内含子隔开,cDNA编码309个氨基酸。免疫荧光实验证实,此酶位于根瘤未感染细胞的过氧化物酶体中,蛋白的分子量为35kD^[14]。

迄今为止已克隆了数种微生物来源的尿酸氧化酶基因(表2)。Legoux等克隆了丝状真菌*A. flavus*来源的尿酸氧化酶基因,此基因编码302个氨基酸,含有两个短的内含子,内含子内部有剪切信号(GCTAAT)。不同来源的尿酸氧化酶的氨基酸序列同源性不高,*A. flavus*来源的尿酸氧化酶与哺乳动物的有42%同源性,与大豆根瘤的有41%同源性,与果蝇的有41%~42%的同源性^[15]。来自*A. globiformis*的尿酸氧化酶的氨基酸序列与来自*C. flavigena*,*C. utilis*和*Bacillus* sp. TB-90的分别有67%、34%和23%的同源性。在所有克隆的尿酸氧化酶基因所编码的蛋白质中普遍存在两个共同的保守序列,结构域A[Y(or H)-G-K-X-X-V]和结构域B[N-S-X-V(or I)-V(or I)-A(or P)-T-D-S(or T)-X-K-N],这些保守结构在各种生物中略有变化,但被置换的氨基酸的化学性质并没有改变^[9]。

表2 微生物来源尿酸氧化酶基因的克隆及其表达

菌株来源	基因		表达系统	尿酸氧化酶	
	大小(kb)	内含子		大小(kD)	表达量
<i>A. flavus</i>	1.2	2	<i>E. coli</i> K12	32	细胞总蛋白4%
	1.2	2	<i>S. cerevisiae</i>	32	细胞总蛋白13%
	1.2	2	<i>A. flavus</i>	32	酶产量比出发菌株提高了20倍
<i>C. utilis</i>	0.9	无	<i>E. coli</i> JM109	34	细胞可溶蛋白20%
<i>Arthro bacter globiformis</i>	0.9	无	<i>E. coli</i> DH1	33	重组菌产酶量比供体菌高20倍
<i>Bacillus</i> sp TB-90	1.4	无	<i>E. coli</i> JM109	37	
symbiont of <i>Nilaparvata lugens</i>	0.9	1	<i>E. coli</i> PLYsS	32	酶比活仅约为真菌来源尿酸氧化酶的五分之一

天然来源的尿酸氧化酶由于受产酶条件及产酶水平的影响,而限制了在商业化生产中的有效应用,因此尿酸氧化酶的异源表达逐渐成为研究的热点。目前已有*A. flavus*、*C. utilis*、*Arthro bacter globiformis*和symbiont of *Nilaparvata lugens*的尿酸氧化酶基因在大肠杆菌中进行了异源表达,均获得了有生物活性的蛋白质产物(见表2)。另外*A. flavus*的尿酸氧化酶基因在酿酒酵母*Saccharomyces cerevisiae*中也进行了表达,尿酸氧化酶的表达量占到了菌体总蛋白的13%^[16]。但大肠杆菌和酿酒酵母来源的重组尿酸氧化酶,仍然存在酶产量低,分离纯化程序复杂,酶

抗原性高,需要经过修饰才可用于治疗等问题^[17]。

近年来,汉逊酵母作为外源基因表达系统越来越受到人们的重视,多种具有重要医用价值的蛋白质在该系统中实现了有效表达。本实验室从产朊假丝酵母中克隆到编码尿酸氧化酶的基因,并首次将其重组到汉逊酵母基因组中实现了分泌表达,表达出了完全有生物学活性的酶,产酶量比供体菌提高了30多倍。对其发酵条件和分离纯化方法的进一步优化,将为利用汉逊酵母表达系统生产尿酸氧化酶奠定重要的基础,具有广阔的应用前景。

4 结语

尿酸氧化酶是一种重要的医药用酶,在临床诊断和高尿酸相关疾病治疗上具有非常广泛的应用前景。目前已有产朊假丝酵母、黄曲霉、枯草芽孢杆菌等微生物被用于尿酸氧化酶的商业化生产,但是普遍存在酶产量低、分离纯化程序复杂、酶学性质不稳定、抗原性高的问题。

微生物种类繁多,代谢类型多种多样,由此产生很多对人类有益的代谢产物,为现代医药的发展做出了重大贡献。对现有微生物资源进行高通量筛选,有可能找到性能上更适合医药应用的酶,目前已有热稳定性在70℃以上的尿酸氧化酶被分离^[18,49]。另外利用现代生物技术对酶蛋白进行分子改造,通过对酶进行定向进化和化学修饰,可以获得酶学性质更加稳定的尿酸氧化酶。选择有效的异源表达系统进行尿酸氧化酶的分泌型高效表达是提高酶产量和简化分离纯化工艺的有效途径。汉逊酵母表达系统因其对外源基因的高效分泌表达、对外源蛋白的合适的糖基化修饰等特点而成为合成更适合医药需要的尿酸氧化酶的理想微生物细胞工厂。

参考文献

[1] Imhoff R D , Power N P , Borrok M J , *et al.* *Biochemistry* ,2003 ,**42** (14) :4094 ~ 4100 .

- [2] David L , Nelson , Michael M , *et al.* *Lehninger' s principles of biochemistry* (4th edition) . New York : W H Freeman & Company , 2004 . pp. 866 ~ 876 .
- [3] 叶任高 , 陆再英 . 内科学 (第五版) . 北京 : 人民卫生出版社 , 2002 . pp. 877 ~ 884 .
- [4] Vogt B . *Nephrol Dial Transplant* ,2005 **20** (2) :431 ~ 433 .
- [5] Baeksgaard L , Sorensen J B . *Cancer Chemother Pharmacol* ,2003 ,**51** (3) :187 ~ 192 .
- [6] Bosly A , Sonet A , Pinkerton C R , *et al.* *Cancer* ,2003 ,**98** (5) :1048 ~ 1054 .
- [7] Goldman S C , Holcberg J S , Finklestein J Z , *et al.* *Blood* ,2001 ,**97** : 2998 ~ 3003 .
- [8] Liu J , Li G , Liu H , *et al.* *Appl Biochem Biotechnol* ,1994 **47** (1) :57 ~ 63 .
- [9] Suzuki K , Sakasegawa S , Misaki H , *et al.* *Biosci Bioeng* ,2004 ,**98** (3) : 153 ~ 158 .
- [10] Bonnete F , Vivares D , Robert C H , *et al.* *J Cryst Growth* ,2001 ,**232** : 330 ~ 339 .
- [11] Bongaerts G , Uitzetter J , Brouns R , *et al.* *Biochim Biophys Acta* ,1978 , **527** (3) :348 ~ 358 .
- [12] Duncan , Patricia H , Gochman N , *et al.* *Clin Chem* ,1982 **28** (2) :284 ~ 293 .
- [13] Jeffrey D , Robert A . *Arthritis Rheum* ,2004 **50** (8) :2400 ~ 2414 .
- [14] Nguyen T , Zelechowska M , Foster V , *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1985 **82** :5040 ~ 5044 .
- [15] Legoux R , Delpech B , Dumont X , *et al.* *J Biol Chem* ,1992 **267** :8565 ~ 8570 .
- [16] Leplatois P , Le Douarin B , Loison G . *Gene* ,1992 **122** (1) :139 ~ 145 .
- [17] Li J , Chen Z , Hou L , *et al.* *Protein Expr Purif* ,2006 **49** (1) :55 ~ 59 .
- [18] Lotfy W A . *Bioresour Technol* ,2007 ,doi :10. 1016/j. biortech. 2007. 01. 048 .
- [19] Xue L , Xiao H , Gui Q , *et al.* *Process Biochem* ,2005 **40** :3749 ~ 3753 .