

酶化学修饰的应用潜力

罗贵民 曹淑桂

(吉林大学酶工程实验室,长春)

提 要

本文评论了酶化学修饰在酶工程中的应用潜力,介绍了这方面的最新进展。事实证明,只要选择的化学修饰剂及修饰方法合适,有可能在较大范围内改变酶的性质,如稳定性和溶解度、酶催化活性和选择性等,从而创造天然酶所不具备的优良特性,扩大酶的应用范围。

关键词 酶,辅酶,辅因子,化学修饰

众所周知,酶的化学修饰已是酶活性部位研究的常用方法,但很少有人评论酶化学修饰在酶工程中的作用。近年来,这方面的研究论文日益增加,研究成果不断涌现,充分显示了酶化学修饰的应用潜力,本文就此作一简要评述,介绍这方面的最新进展。

一、酶与化学修饰相关的结构特点

对化学修饰而言,区别酶分子的内部和外部是比较方便的。在大多数溶于水的蛋白质中,永久带电的残基,如 Lys、Arg、Asp、Glu,基本上聚集在酶分子表面;而在酶分子内部则基本上是由非极性氨基酸组成。中性的(酰胺和醇)和并不永久带电的(咪唑)极性基团在酶分子中到处可见。分子内的这些残基的极性是由它们与其它极性残基或与蛋白质的酰胺骨架形成的氢键来调节的。

酶的活性部位是酶进行催化反应之所在。对远离活性部位的氨基酸作重大改变,但又不使酶失活是可能的。然而,对于活性部位的氨基酸,则要求精确的位置控制,严格的机动性,才能保持酶的催化效率和选择性。此外,有的酶需要辅因子。辅因子的改变或转移会使酶的性质发生深刻变化。

二、酶的表面修饰

1. 化学固定化 这是共价表面修饰酶的主要形式。一般是通过酶表面的酸性或碱性残基,将酶共价连接到惰性载体上。固定化后,由于酶所处的微环境的改变,会使酶的性质(最适 pH、最适温度、稳定性等),特别是动力学性质发生改变。例如,固定在带电载体上的酶,由于介质中的质子靠近载体并与载体上的电荷发生作用,结果使酶的最适 pH 向碱性(阴离子载体)或酸性(阳离子载体)方向移动。这个性质有重要的实际应用。如果一个工艺过程需要几个酶协同作用,而这几个酶的最适 pH 又不一致的话,可用固定化法使不同酶的最适 pH 彼此靠近,从而简化工艺过程。糖化酶固定在阴离子载体上后,其最适 pH 由 4.6 升至 6.8,与葡萄糖异构酶的最适 pH (7.5) 靠近了^[1],因而有可能简化制备高果糖浆的工艺过程。

固定化能改变酶对底物的亲和力。如果载体和底物带相反电荷的话,米氏常数 (K_m) 将降低;带相同电荷时, K_m 将增加。

酶共价连接于载体上的固定化,原则上,可以增加酶分子的构象稳定性,防止酶构象伸展而失活。但酶与载体的连接点必须达到一定数

目,才能使酶构象坚牢稳固。已经研制了一些增加束缚点的方法,成功地使酶的稳定性大大提高^[2]。

2. 小分子修饰作用 将 α -胰凝乳蛋白酶表面的氨基修饰成亲水性更强的 $-\text{NHCH}_2\text{COOH}$,结果,使该酶抗不可逆热失活的稳定性,在60℃时提高1000倍。在更高温度下,稳定化效应更强烈,以致不能在同一温度下与天然酶比较^[3]。这种稳定的酶能经受灭菌的极端条件而不失活,因而有利于用于医药;其次,水溶性稳定的酶制剂,特别是蛋白水解酶和脂解酶在洗涤工业中特别有用。

3. 分子内交联 设法增加酶表面交联键的数目是酶稳定化的方法之一。胰凝乳蛋白酶上的羧基,经碳二亚胺活化后,可与一系列二胺作用。结果发现,用1,4-二氨基丁烷交联胰凝乳蛋白酶后,可得到稳定性有所改善的酶制剂^[4],说明形成的分子内交联键数目较多。

4. 分子间交联 最近有人用双功能试剂使不同的酶进行分子间交联,从而产生杂化酶。有人用戊二醛将胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶交联在一起^[5]。这种固定化的杂化酶的优点是,杂化酶中胰蛋白酶的自溶作用显著降低,同时也使反应器的体积大为减小。胰蛋白酶和碱性磷酸酶交联而成的杂化酶,可作为部分代谢途径的有用模型,测定复杂的生物结构^[6]。将二种大小、电荷和生物功能不同的药用酶交联在一起,则有可能在体内将这二种酶同时输送到同一部位,提高药效^[7]。双酶和多酶络合物在生物化学中的应用日益广泛。酶免疫分析和酶靶就是两个重要的领域。

5. 酶的乙基化、糖基化和甲基化 马肝醇脱氢酶(HLADH)的Lys的乙基化、糖基化和甲基化都能增加HLADH的活力,但其中甲基化使酶活力增加最大,同时酶稳定性也提高了^[8]。更有意义的是,糖的手性影响糖基化酶的性质;糖基化酶和甲基化酶的底物专一性有所改变。这种操纵底物专一性的能力在立体专一性有机合成中特别有用。

6. 大分子修饰作用 可溶性大分子,如聚

乙二醇、右旋糖酐、肝素等,可通过共价键连于酶表面,形成一覆盖层。这种可溶性的固定化酶有很多有用的新性质。如,用聚乙二醇修饰的天冬酰胺酶,不仅可降低或消除酶的抗原性,而且可提高酶的抗蛋白水解的能力,延长酶在体内的半寿期,从而提高药效^[9]。聚乙二醇修饰的人血红蛋白可作为血浆代用品,而且具有输血与血型无关,冻干后可永久保存,避免输血时可能发生的肝炎和爱滋病毒感染等优点^[10]。日本学者将聚乙二醇连到脂肪酶,胰凝乳蛋白酶上,所得产物溶于有机溶剂,可在有机溶剂中有效地起作用^[11]。嗜热菌蛋白酶在水介质中通常催化肽键裂解,但用聚乙二醇修饰后,催化活性显著改变,可在有机溶剂中催化肽键合成反应,已用于制造合成甜味剂(aspartame)的前体^[12]。

三、酶分子的内部修饰

对酶工程而言,酶化学修饰的目的是系统改变酶的专一性,酶作用的最适pH、改变底物抑制和活化的形式,甚至改变酶催化反应的类型。已有一些动力学性质发生改变的例子,也有一些引入新催化活力的例子,修饰结果不可预测。但现在,借助X-射线结晶学和计算机图示技术有可能以和药物设计大致相同的方式,原则上设计修饰剂,而且随着今后用蛋白质工程法修饰酶,而对蛋白质结构理解的增加,也应当有可能预测有限化学修饰的效应。

1. 非催化活性基团的修饰

最经常修饰的残基既可是亲核的(Ser, Cys, Met, Thr, Lys, His),也可是亲电的(Tyr, Trp),或者是可氧化的(Tyr, Trp, Met)。对这类非催化残基的修饰可改变酶的动力学性质,改变酶对特殊底物的束缚能力。

研究得较充分的例子是胰凝乳蛋白酶。将此酶Met-192氧化成亚砷,则使该酶对含芳香族或大体积脂肪族取代基的专一性底物的 K_m 提高2—3倍,但对非专一性底物的 K_m 不变^[13]。这说明, Met-192与酶对专一性底物的束缚口袋相关,也说明,对底物的非反应部分的束缚在

酶催化作用中有重要作用^[44]。

2. 酶蛋白主链的修饰

迄今,主链修饰主要靠酶法。将猪胰岛素转变成人胰岛素就是一个成功的例子。猪和人的胰岛素,仅在B链羧端有一个氨基酸的差别。用蛋白水解酶将猪胰岛素B链末端的Ala水解下来,再在一定条件下,用同一酶将Thr接上去,即可将猪胰岛素转变成人胰岛素^[45]。丹麦的Novo公司仅用二年时间,就把这项实验室成果扩展到工业生产中。

用胰蛋白酶对天冬氨酸酶进行有限水解,切去十几个氨基酸后,酶活力提高5.5倍^[46]。活化酶仍是四聚体,亚单位分子量变化不大,说明天然酶并不总是处于最佳构象状态。

3. 催化活性基团的修饰

酶学家的梦想之一是能任意改变酶的氨基酸顺序。蛋白质工程的出现已使这个梦想变成现实。然而,通过选择性修饰氨基酸侧链成分来实现氨基酸取代更为简捷。这种将一种氨基酸侧链化学转化为另一种新的氨基酸侧链的方法叫作化学突变法。这种方法显然受到是否有专一性修饰剂及有机化学的工艺水平的限制。尽管如此,Bender等人还是成功地将枯草杆菌蛋白酶活性部位的Ser残基转化为半胱氨酸残基^[47]。新产生的巯基枯草杆菌蛋白酶对肽或酯没有水解活力,但能水解高度活化的底物,如硝基苯酯。进行过化学突变的酶有:胰蛋白酶、木瓜蛋白酶等,但突变后的酶都没有活力。有用的修饰要求保持酶的催化活力。修饰前,保护酶的活性部位是可行的办法。对胰凝乳蛋白酶的修饰就采取了这种办法。这里显然有潜力。虽然化学修饰所获得的花样,由于可用试剂的限制,没有蛋白质工程法来得多,但可进一步研制有用的试剂。例如,羟胺-O-硫酸酯是万能的胺化试剂,在水溶液中也有效^[48]。胺化反应可以把疏水氨基酸突变成非天然碱性氨基酸。光化学可能产生更成熟的修饰。另外,通过巴顿反应可以将反应性引入蛋白质中。总之,化学修饰通过它的产生非蛋白质氨基酸的能力,可以有力地补充蛋白质工程技术。

4. 与辅因子相关的修饰

(1) 对依赖辅因子的酶可用二种方法进行化学修饰:第一,如果辅因子与酶的结合不是共价的,则可将辅因子共价结合在酶上。将NAD衍生物共价结合到醇脱氢酶上后,酶仍具有催化活性构象。活力大约是使用过量游离NAD时活力的40%,而且能抵抗AMP的抑制^[49]。这是解决合成中昂贵的辅因子再循环问题的重要进展。第二,引入新的或修饰过的具有强反应性的辅因子。巯基专一试剂能改变某些依赖黄素的氧化酶所催化的反应。例如,用disulphiram处理黄嘌呤脱氢酶,可将其转化为黄嘌呤氧化酶^[20]。这类为某一反应而使化合物的氧化作用发生改变,在经济上颇具吸引力。

(2) 最有创造性的修饰方法是将新的辅酶引入结构已弄清的蛋白质上。这要求对辅酶本身的化学要有清楚了解。在实验上则是如何让辅酶更好地适应新的环境。迄今最好的例子是Kaiser的黄素木瓜蛋白酶^[21]。黄素的溴酰衍生物可与木瓜蛋白酶的Cys-25共价结合成为黄素木瓜蛋白酶,其动力学行为可与老黄酶相比拟。这类半合成酶的开发虽然刚开始,但已可预见其许多实际应用。酚类的羟化和硫醇酯立体专一性地氧化成手性亚砜,都可用依赖黄素的半合成酶来完成。用黄素血红蛋白可以模拟细胞色素P-450的某些有意义的化学性质。半合成酶的优点来自它的多样性。只要简单地改变蛋白质模板,就可能调节最适pH,改善催化剂的稳定性,精细调节反应的底物专一性和立体选择性。利用半合成酶还可获得关于蛋白质结构和催化活性间的详细信息,最终,这些信息可用于构建更有效的第二代、第三代催化剂。其它的辅酶,如维生素B₁、吡哆醛、吡啶、酞菁、甚至金属离子都可以加入到蛋白质的束缚部位,产生新的实用催化剂。

(3) 金属酶中的金属取代。酶分子中的金属取代可以改变酶的专一性、稳定性及其抑制作用。例如,酰化氨基酸水解酶活性部位中的锌被钴取代时,酶的底物专一性和最适pH都有改变^[22]。锌酶对N-氯-乙酰丙氨酸的最适

pH 是 8.5, 而钴酶的最适 pH 是 7.0; 钴酶对 N-氯-乙酰丙氨酸等六种底物的水解活力增加, 而对 N-氯-乙酰蛋氨酸等三种底物的活力降低。因此, 在实用上, 对不同的底物可选用锌酶与钴酶。

天然含铁超氧化物歧化酶中的铁原子被锰取代后, 酶的稳定性和抑制作用发生显著改变。重组含锰酶对 H_2O_2 的稳定性显著增强, 对 NaN_3 的抑制作用的敏感性显著降低^[23]。虽然金属酶中活性部位上的金属交换这一修饰技术尚处于幼年时期, 但上述例子足以说明这种技术在实用上的巨大意义, 应当给予足够的重视。

5. 肽链伸展后的修饰

为了有效地修饰酶分子的内部区域, Mozhaev 等提出, 先用脲或盐酸胍处理酶, 使酶分子的肽链充分伸展, 这就提供了化学修饰酶分子内部疏水基团的可能性。然后, 让修饰后的伸展肽链, 在适当条件下, 重新折叠成具有某种催化活力的构象。遗憾的是, 到目前为止, 这只是一个想法, 还没有成功的例子。然而十分有意义的是, 他们用这种构象重建法, 使不可逆热失活的固定化胰蛋白酶和 α -胰凝乳蛋白酶重新活化, 活力基本上完全恢复到酶失活前的水平, 而且这种热失活-重新活化的过程可连续重复四次之多^[24]。这种失活酶的再活化, 显然具有重大的经济效益。

Saraswathi 等描述了一种新奇的原则上可能普遍适用的改变酶底物专一性的方法^[25]。先让酶变性, 然后加入相应于所希望酶活力的竞争性抑制剂, 待获得所希望的活性构象时, 用戊二醛交联, 以固定这个构象, 然后透析除掉抑制剂。他们用丙酸作竞争性抑制剂, 从核糖核酸酶出发, 制得一种“酸性酯酶”, 从而改变了酶的底物专一性, 创造了新的酶活力。

综上所述, 可以清楚看出酶化学修饰在酶工程中显示的潜力。显示潜力的最好证明是, 酶修饰开发了新反应。下面的例子更能说明简单化学修饰的威力。许多重要的生物活性肽含有 D-氨基酸。由于肽酶对 L-氨基酸的正常底物专一性, 因此不可能在肽酶催化作用下合成

含 D-氨基酸的肽。但是, 如果将胰凝乳蛋白酶上的 Met-192 修饰成亚砷, 则可使这类反应能够实际应用。未修饰酶没有催化肽合成的能力, 而修饰酶在合成 Z-L-Tyr-D-Met-OMe 中的活力保持 92%, 收率 80%。

大量事实证明, 酶化学修饰的研究, 不仅在理论上, 而且在实用上均有重要意义, 它已成为生物技术领域中的重大课题。酶工程作为现代生物技术的一个重要组成部分, 充满生机, 发展迅速, 必将在实用上、理论研究上发挥越来越大的作用。

参 考 文 献

- 1 Zhou H *et al.* *J Chem Technol Biotechnol*, 1990; 1: 141
- 2 Martinek K *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1977; 485: 1
- 3 Melik-Nubarov N S *et al.* *Biotech Lett*, 1987; 9: 725
- 4 Torchillin V P *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1977; 522: 227
- 5 Rajput Y S *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1988; 31: 220
- 6 Rajput Y S *et al.* *Biotechnol Appl Biochem*, 1988; 10: 242
- 7 Wang D. *Biochemistry*, 1979; 18(20): 4449
- 8 Tsai C S *et al.* *Bioorg Chem*, 1985; 13: 47
- 9 Cao S G *et al.* *Chem J Chinese Univ*, 1989; 10(3): 289
- 10 稻田祐二, タンパク質ハイブリッド. 共立出版株式会社, 1987; 52
- 11 Takahashi K *et al.* *J Org Chem*, 1985; 50: 3414
- 12 Nakanishi K *et al.* *Biotech*, 1985; 3: 459
- 13 Knowles J R. *Biochem J*, 1965; 95: 180
- 14 Page M I. In: *The Chemistry of Enzyme Action*, Amsterdam: Elsevier, 1984: Ch. 1
- 15 Morihara K *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1980; 92: 396
- 16 Cheng Y H *et al.* *Ann N Y Acad Sci*, 1987; 501: 88
- 17 Neet K E *et al.* *Proc Nat Acad Sci USA*, 1966; 56: 1606
- 18 Wallace R G. *Aldrichimica Acta*, 1980; 13: 3
- 19 Mansson M-O *et al.* *Eur J Biochem*, 1978; 86: 455
- 20 Kaminski Z W *et al.* *Biochem J*, 1982; 207: 341
- 21 Kaiser C T *et al.* *Science*, 1984; 226: 505
- 22 Gilles I *et al.* *Z. Naturforsch*, 1981; 36c: 751
- 23 Gregory E M *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1983; 220: 293
- 24 Mozhaev V V *et al.* *Methods Enzymol*, 1987; 135: 586
- 25 Saraswathi S *et al.* *Enz Microb Technol*, 1984; 6: 98

[本文于 1989 年 6 月 24 日收到]