

L-aminoacylase 基因選殖與酵素活性分析

郭怡君、簡宏堅

E-mail: 9511401@mail.dyu.edu.tw

摘要

根據 *Deinococcus radiodurans* R1 之基因體中找出 兩段基因序列 (DR1711 和DR0339)，它們與L-aminoacylase 的相同度很高，以此作設計為引子之依據，並以抗輻射細菌 *D. radiodurans* CCRC 12827 的染色體DNA 當模板，利用PCR 分別放大 $laa1$ 和 $laa2$ 之不同DNA 序列片段。將 $laa1$ 或 $laa2$ 基因選殖入 *Escherichia coli* 菌體內，可表現L-aminoacylase 的活性。 $laa1$ 的 open reading frame (ORF) 全長1,167 bp， $laa2$ 的ORF 長度則是1,179 bp，各自均可轉譯出LAA1 蛋白分子量41,443 Da 與LAA2 蛋白分子量42,607 Da，兩者都是胞內酵素。LAA1 經胺基酸殘基序列比對，結果與 *D. radiodurans* R1 N-acyl-L-amino acid amidohydrolase (DR1711) 的胺基酸相同度98%，LAA2 也作胺基酸殘基序列比對，和*D. radiodurans* R1 probable N-acyl-L-amino acid amidohydrolase (DR0339) 相同度高達 99%。將*D. radiodurans* 之 L-aminoacylase ORF 選殖入pQE30 載體，轉形至*E. coli* Nove Blue，再用Co-NTA 管柱回收此酵素。經過酵素活性分析後，發現 LAA1 最適反應溫度為45，而LAA2 最適反應溫度是35。在 最適pH 的實驗中得知LAA1 是在pH 8.0 有最佳活性，而LAA2 是在pH 7.0 有最好的活性。在無金屬離子條件下，LAA1 與LAA2 不具任何催化能力，而 Mn^{2+} 及 Co^{2+} 等離子均能提昇酵素活性，結果顯示其可能是 metalloenzyme。此外，用N-CBZ-Gly-Ala 為基質時，LAA1 與LAA2 的carboxypeptidase 比活性最大，而N-acetyl-L-His 當基質時，LAA1 的L-aminoacylase 比活性最佳，在LAA2 L-aminoacylase 比活性的測試，是在以N-chloroacetyl-L-Phe 作基質 時有最佳的比活性，用L-ornithine-L-ala 為基質時，僅有LAA2 具 dipeptidase 活性。此結果顯示LAA2 為carboxypeptidase、L-aminoacylase 與dipeptidase 參功能酵素，而LAA1 是 carboxypeptidase 及L-aminoacylase 的雙功能酵素。

關鍵詞：Deinococcus radiodurans、L- aminoacylase、基因選殖、酵素活性分析。

目錄

封面內頁 簽名頁 授權書.....	iii	中文摘要.....	iv	英文摘要.....	iv
要.....	vi	誌謝.....	viii	目錄.....	ix
圖目錄.....	xiii	表目錄.....	xv	第一章 前言.....	1
第二章 材料與方法.....	4	第一節 菌株及質體.....	4	第二節 藥品.....	4
第三節 L-aminoacylase (laa) 基因的選殖.....	4	第四節 laa 基因的表現.....	15	第五節 LAA1 與LAA2 酵素的生化特性.....	20
第三章 結果.....	24	第一節 laa 基因的選殖.....	24	第二節 laa 基因的表現.....	26
第三節 LAA1 與LAA2 酵素的生化特性分析.....	29	第四章 結論.....	33	第一節 Deinococcus radiodurans LAA1 與LAA2 的胺基酸序列.....	33
第二節 laa1 與laa2 基因大量表現.....	33	第三節 LAA2 分解細胞壁的測試.....	34	第四節 LAA1 與LAA2 酵素的最適反應溫度.....	35
第五節 pH 值對LAA1 與LAA2 酵素活性的影響.....	35	第六節 金屬離子與金屬螯合劑對LAA1 與LAA2 酵素活性的影響.....	36	第七節 LAA1 與LAA2 對基質的選擇性.....	36
參考文獻.....	77	附錄.....	82	圖目錄 圖1. L-homophenylalanine生合成的示意圖 40 圖2. 設計LAA1引子 41 圖3. 設計LAA2引子 42 圖4. 構築質體 43 圖5. (A) <i>D. radiodurans</i> 染色體電泳圖 (B) $laa2$ PCR電泳圖 44 圖6. 限制酵素檢測LAA2 45 圖7. $laa1$ PCR電泳圖 46 圖8. 限制酵素檢測LAA1 47 圖9. LAA1與LAA2 之SDS-PAGE電泳圖 48 圖10. 添加IPTG的測試 49 圖11. 更換表現載體的測試 50 圖12. 比較不同表現載體 51 圖13. 更換不同轉形菌株的測試 52 圖14. FPLC分析LAA2蛋白 53 圖15. $laa1$ 基因序列比對. 54 圖16. LAA1胺基酸序列比對 55 圖17. $laa2$ 基因序列比對 56 圖18. LAA2胺基酸序列比對 57 圖19. LAA1與LAA2胺基酸序列比對 58 圖20. <i>D. radiodurans</i> 細胞壁成分 59 圖21. HPLC的標準曲線 60 圖22. HPLC的LAA1曲線 61 圖23. HPLC的LAA2曲線 62 圖24. LAA1最適溫度 63 圖25. LAA2最適溫度 64 圖26. LAA1最適pH值 65 圖27. LAA2最適pH值 66 表目錄 表1. 本實驗所使用的菌株與質體 67 表2. LAA1與LAA2 蛋白序列資料庫的比對 68 表3. 金屬離子對LAA1酵素活性的影響 69 表4. 金屬離子對LAA2酵素活性的影響 70 表5. LAA1 與LAA2受質專一性 71 表6. 化學合成 <i>D. radiodurans</i> 細胞壁胜? 72 表7. LAA2對 <i>D. radiodurans</i> 細胞壁胜?打漪 " 73 表8. 比較來自不同菌株之L-aminoacylase 74 附錄目錄 附錄1. 本實驗所使用的藥劑配方 82 附錄2. HPLC的AccQ Tag使用方法 89	

參考文獻

1. Anders MW, Dekant W. (1994) Aminoacylases. *Adv Pharmacol.* 27:431 – 48.
2. Bartel B, Fink GR. (1995) ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. *Science.* 268(5218):1745-8.
3. Cheng TC, Ramakrishnan V, Chan SI. (1999) Purification and characterization of a cobalt-activated carboxypeptidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Protein Sci.* 8(11):2474-86.
4. Colombo S, Toietta G, Zecca L, Vanoni M, Tortora P. (1995) Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a carboxypeptidase-encoding gene from the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *J Bacteriol.* 177(19):5561-6.
5. Curley P, van der Does C, Driessen AJ, Kok J, van Sinderen D. (2003) Purification and characterisation of a lactococcal aminoacylase. *Arch Microbiol.* 179(6):402-8.
6. Curley P, van Sinderen D. (2000) Identification and characterisation of a gene encoding aminoacylase activity from *Lactococcus lactis* MG1363. *FEMS Microbiol Lett.* 183(1):177-82.
7. Gentzen I, Löffler HG, Schneider F. (1980) Aminoacylase from *Aspergillus oryzae*. Comparison with the pig kidney enzyme. *Z Naturforsch.* 35(7-8):544-50.
8. Giardina T, Biagini A, Dalle Ore F, Ferre E, Reynier M, Puigserver A. (1997) The hog intestinal mucosa acylase I: subcellular localization, isolation, kinetic studies and biological function. *Biochimie.* 79(5):265-73.
9. Groger H, Trauthwein H, Buchholz S, Drauz K, Sacherer C, Godfrin S, Werner H. (2004) The first aminoacylase-catalyzed enantioselective synthesis of aromatic beta-amino acids. *Org Biomol Chem.* 2 (14): 1977-8.
10. Hollingsworth EJ, Isupov MN, Littlechild JA. (2002) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of L-aminoacylase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 58(3):507-10.
11. Hu HY, Hsu WH, Chien HR. (2003) Characterization and phylogenetic analysis of a thermostable N-carbamoyl-L-amino acid amidohydrolase from *Bacillus kaustophilus* CCRC11223. *Arch Microbiol.* 179 (4): 250-7.
12. Huang JJ, Han JI, Zhang LH, Leadbetter JR. (2003) Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol.* 69(10):5941-9.
13. Ishikawa K, Ishida H, Matsui I, Kawarabayashi Y, Kikuchi H. (2001) Novel bifunctional hyperthermostable carboxypeptidase / aminoacylase from *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Appl Environ Microbiol.* 67:673-9.
14. Javid-Majd F, Blanchard JS. (2000) Mechanistic analysis of the argE-encoded N-acetylornithine deacetylase. *Biochemistry.* 39(6):1285-93.
15. Koreishi M, Asayama F, Imanaka H, Imamura K, Kadota M, Tsuno T, Nakanishi K. (2005) Purification and characterization of a novel aminoacylase from *Streptomyces mobaraensis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 69 (10): 1914-22.
16. Lee SH, Minagawa E, Taguchi H, Matsuzawa H, Ohta T, Kaminogawa S, Yamauchi K. (1992) Purification and characterization of a thermostable carboxypeptidase (carboxypeptidase Taq) from *Thermus aquaticus* YT-1. *Biosci Biotechnol Biochem.* 56(11):1839-44.
17. Mitta M, Ohnogi H, Yamamoto A, Kato I, Sakiyama F, Tsunasawa S. (1992) The primary structure of porcine aminoacylase 1 deduced from cDNA sequence. *J Biochem (Tokyo).* 112(6):737-42.
18. Pittelkow S, Lindner H, Rohm KH. (1998) Human and porcine aminoacylase I overproduced in a baculovirus expression vector system: evidence for structural and functional identity with enzymes isolated from kidney. *Protein Expr Purif.* 12(2):269-76.
19. Roche DM, Byers JT, Smith DS, Glansdorp FG, Spring DR, Welch M. (2004) Communications blackout? Do N-acylhomoserine-lactone-degrading enzymes have any role in quorum sensing? *Microbiology.* 150(7):2023-8.
20. Sakanyan V, Desmarez L, Legrain C, Charlier D, Mett I, Kochikyan A, Savchenko A, Boyen A, Falmagne P, Pierard A. (1993) Gene cloning, sequence analysis, purification, and characterization of a thermostable aminoacylase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl Environ Microbiol.* 59(11):3878-88.
21. Story SV, Grunden AM, Adams MW. (2001) Characterization of an aminoacylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol.* 183(14):4259-68.
22. Taylor IN, Brown RC, Bycroft M, King G, Littlechild JA, Lloyd MC, Praquin C, Toogood HS, Taylor SJ. (2004) Application of thermophilic enzymes in commercial biotransformation processes. *Biochem Soc Trans.* 32 (2): 290-2.
23. Toogood HS, Hollingsworth EJ, Brown RC, Taylor IN, Taylor SJ, McCague R, Littlechild JA. (2002) A thermostable L-aminoacylase from *Thermococcus litoralis*: cloning, overexpression, characterization, and applications in biotransformations. *Extremophiles.* 6(2):111-22.
24. Tsai YC, Lin CS, Tseng TH, Lee H, Wang YJ. (1992) Production and immobilization of D-aminoacylase of *Alcaligenes faecalis* DA1 for optical resolution of N-acyl-DL-amino acids. *Enzyme Microb Technol.* 14(5):384-9.
25. Wakayama M, Shiiba E, Sakai K, Moriguchi M. (1998) Purification and Characterization of L-Aminoacylase from *Pseudomonas maltophilia* Bl. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* 85(3):278-82.
26. Wakayama M, Katsuno Y, Hayashi S, Miyamoto Y, Sakai K, Moriguchi M. (1995) Cloning and sequencing of a gene encoding D-aminoacylase from *Alcaligenes xylosoxydans* subsp. *xylosoxydans* A-6 and expression of the gene in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 59(11):2115-9.
27. Wang WC, Chiu WC, Hsu SK, Wu CL, Chen CY, Liu JS, Hsu WH. (2004) Structural basis for catalytic racemization and substrate specificity of an N-acylamino acid racemase homologue from *Deinococcus radiodurans*. *J Mol Biol.* 342 (1): 155-69.
28. White O, Eisen JA, Heidelberg JF, Hickey EK, Peterson JD, Dodson RJ, Haft DH, Gwinn ML, Nelson WC, Richardson DL, Moffat KS, Qin H, Jiang L, Pampile W, Crosby M, Shen M, Vamathevan JJ, Lam P, McDonald L, Utterback T, Zalewski C, Makarova KS, Aravind L, Daly MJ, Minton KW, Fleischmann RD, Ketchum KA, Nelson KE, Salzberg S, Smith HO, Venter JC, Fraser CM. (1999) Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science.* 286(5444):1571-7.
29. Xie Y, Lou R, Li Z, Mi A, Jiang Y. (2000) DPAMPP in catalytic asymmetric reactions: enantioselective synthesis of L-homophenylalanine. *Tetrahedron: Asymmetry.* 11:1487-94.
30. Yang YB, Hu HL, Chang MC, Li H, Tsai YC. (1994) Purification and characterization of L-aminoacylase from *Alcaligenes denitrificans* DA181. *Biosci Biotechnol Biochem.* 58(1):204-5.