

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

動物中的嗜熱性酵素 -

醯亞氨水解酵素反應機制之探討

計畫類別： 個別型計畫

計畫編號： NSC 89-2311-B-009-005

執行期間： 88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

計畫主持人：楊裕雄

執行單位：國立交通大學 生物科技學系

中 華 民 國 89 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

動物中的嗜熱性酵素 - 醯亞胺水解酵素反應機制之探討

Mechanism of Imidase – A Thermophilic Enzyme from Animals

計畫編號：NSC 89-2311-B-009-005

執行期限：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：楊裕雄 國立交通大學 生物科技學系

E-mail: ysyang@cc.nctu.edu.tw

計畫參與人員：林聖偉(研究生兼任助理) 國立交通大學 生物科技學系

中文摘要：

嗜熱性豬肝醯亞胺水解酵素(imidase)是一廣效性的解毒酵素，由於它能催化水解多種的基質，亦被稱為 dihydropyrimidinase (EC.3.5.2.2) 和 hydantoinase。我們從豬肝中純化出酵素，以便進行之後的實驗。我們的研究目的是想要瞭解在不同 pH 和不同溫度條件環境下，醯亞胺水解酵素對基質的選擇性的影響。我們發現在室溫下對 hydantoins 類的衍生物而言，酵素活性會隨著衍生物所帶的取代基立體障礙增大而減小，但是在高溫則不一定。而帶有 5,5-雙取代基或 NH₂-取代基都觀察不到活性。我們將基質大致分為三大類：五環的 hydantoins 類，六環的 dihydropyrimidines 類和五環及六環的 cyclic imides 類，其最適的 pH 值分別為 8.0, 9.5, 8.5。六環的 cyclic imide 和 dihydropyrimidines 具有相似形狀 K_m 的 pH 趨勢圖，而不同於五環的 cyclic imide 或 hydantoin，故 K_m 的 pH 趨勢圖是與基質的環狀結構相關的。而 cyclic imides 和 hydantoins 類 V_{max} 的趨勢圖是呈現出鐘形曲線，與 dihydropyrimidines 類不一樣。酵素的特異性也是與溫度相關的，在不同溫度條件下，cyclic imides 和 hydantoins 類的 pH 趨勢圖都相似，而 dihydropyrimidines 類則否。隨著溫度的不斷上升，六環的 dihydropyrimidines 和 glutarimide 的 K_m 與 V_{max} 值也是隨之增加，但是五環的 hydantoin 和 succinimide 的 K_m 與 V_{max} 值則不受溫度變化的影響。故我們可結論出在不同 pH 與溫度條件下，基質取代基大小與基質環狀結構(五環或六環)和酵素的基質特異性具有相當大的影響。

關鍵詞：醯亞胺水解酵素；解毒酵素；酵素反應機制。

Abstract

Due to its broad substrate specificity, thermophilic imidase is also known as dihydropyrimidinase (EC 3.5.2.2) and hydantoinase. The purpose of this research is to understand the effect of temperature and pH on the substrate specificity of imidase. At room temperature, hydrolytic activity of imidase decrease toward hydantoins as its size of side chain increase. Opposite results are observed at 60 °C, in which condition hydantoins with large side chain become much better substrates. Three functional groups of substrate include six and five-member ring are used for this study. The optimal pHs of imidase are 8.0, 8.5, 9.5 for V_{max}/K_m of hydantoins, cyclic imides and dihydropyrimidines, respectively. Effect of pH on V_{max} and K_m is dependent on the substrate used. K_m of a six-member ring cyclic imide and dihydropyrimidines are insensitive to the change of pHs from 7.5 to 9.5. The pH profile of V_{max} of cyclic imides and hydantoins exhibit bell shapes profile, which is different from that of dihydropyrimidines. Substrate specificity of imidase for imides, hydantoins and dihydropyrimidines is temperature dependent. The shapes of pH profiles may remain similar (hydantoins and cyclic imides) or may differ (dihydropyrimidines) at different temperatures. Both K_m and V_{max} increase steadily with the elevation of reaction temperature up to 60 °C for dihydropyrimidines and glutarimide but not for hydantoins and succinimide. We conclude that ring structure and side chain are both

important for the substrate selection of imidase at different temperature and pH.

Keywords: Imides; Imidase; enzyme mechanism; enzymes of detoxication.

緣由與目的

在 1930 年代後有關利用微生物或酵素水解 hydantoin 衍生物的文獻開始出現。在 1932 年 Sobotka 發表用 *Aspergillus sp.* 將 5-phenyl-5-ethylhydantoin 經酵素水解成左旋型產物 [Sobotka, 1932]。在 1946 年 Bernheim 等發現雜食性動物的肝臟能迅速水解 hydantoin，在 1947 年他們也發現在多種植物種子中也有此類酵素活性 [Bernheim and Bernheim, 1946]。在 1950 年和 1960 年代，對於 dihydropyrimidinase 的功用和嘧啶代謝開始有了探討。到了 1970 年隨著工業界需要製造 D-thioethylglycine，D-*p*-hydroxyphenylglycine 來合成半合成盤尼西林或 cephalosporins 的原料，酵素水解法開始被重視。Dudley 等人發表將 5-phenylhydantoin 經 D 型選擇，水解成相對應的 *N*-carbamoyl-D 型胺基酸 [Dudley et al., 1970]，而 Cecere 等人在 1975 年發表利用小牛肝純化得到 dihydropyrimidinase，並利用 D,L-5-momostituted hydantoin 製造出其相對應的 *N*-carbamoyl D-amino acids，使此酵素未來可以應用在製備具有光學活性的 D 型胺基酸 [Cecere et al., 1975]。在 1980 年 Yamada 等也利用微生物製造出 *N*-carbamoyl-D-phenylglycine [Yamada et al., 1980]。利用此酵素生產具有工業用途的化學品，如 D-hydroxyphenylglycine (DHPG)，及其他具有光學活性的胺基酸。而且利用酵素生產方式不僅是得到光學活性化學品最有效的途徑，其過程對環境的傷害也最小；不像是化學法的光學分割，通常必須將 -OH 及 -NH₂ 保護，再進行光學分割，分割後且需再將保護基去除，導致工程複雜且回收率低，廢水的排放更是造成環境的污染 [Williams, 1989]。D—hydroxyphenylglycine 是一非天然型的 D-胺基酸，其用途很廣泛，可用於半合成盤尼西林之類抗生素如

amoxicillin 及頭孢子素類如 cefoperazone、cefpiramide 等的中間物，此外，一些新藥如 asproxillin、cefbuperazone、cefpiramide 等的生成亦需要 DHPG。在 1983 年，Kanegafuchi 化學公司第一個把酵素水解 hydantoin 產生 D-hydroxyphenylglycine 的程序變成商業化 [Syldatk et al., 1990]。其他具有光學活性的胺基酸，可以作為食品、醫藥、飼料添加物等用途，在製藥領域上，可用於半合成 peptide、賀爾蒙、除蟲菊劑及殺蟲劑。具有光學活性的胺基酸是近年來注目的焦點，未來的發展及新藥的開發更是無可限量。

醯亞胺水解酵素的來源很廣泛，可從 *Agrobacterium species* [Runser and Meyer, 1993]、*Pseudomonas striata* [Morin et al., 1986]，豆類 [Mazus et al., 1967]、牛肝 [Brooks et al., 1983; Cecere et al., 1978; Lee et al., 1987]，小牛肝 [Kautz and Schnackerz, 1989]，豬肝 [Jahnke et al., 1993] 和鼠肝 [Kikugawa et al., 1994; Yang et al., 1993] 中得到。此類酵素在工業用途上最重要的特性之一為其基質的旋光選擇性，最初被發現有旋光選擇性是在 5-methylhydantoin 和 5-isopropylhydantoin 水解 [Dudley and Roberts, 1978]。一般來說在旋光選擇性上，來自微生物的醯亞胺水解酵素具有 D-型特異性、L-型特異性及 D,L-型均會水解作用的三種形式；而在哺乳動物中則均為 D-型。不同來源的此類酵素分子量也有點不同。如微生物的 *Pseudomonas putida* 77 分子量為 300 KDa，單體為 70 和 80 KDa [Ogawa et al., 1995]；*Blastobacter sp.* A17p-4 分子量為 105 KDa，單體為 35 KDa [Ogawa et al., 1997]；鼠肝分子量為 230 KDa，單體為 53 KDa [Yang et al., 1993]；牛肝分子量為 217 KDa，單體為 54 KDa [Kautz and Schnackerz, 1989]；豬肝分子量為 210 KDa，單體為 54 KDa [Jahnke et al., 1993]。大多數哺乳動物的酵素都為四聚體，分子量約為 220 KDa，單體約為 54 KDa。不同來源的此類酵素，有的與金屬離子緊緊鍵結，需要金屬離子的存在才有活性，有些則無金屬離子的存在 [Brooks et al., 1983]。

金屬對酵素的影響如在 *Arthrobacter crystallopoietes* AM2 加入高劑量的金屬螯合劑對活性沒有影響[Moller et al., 1988]; *Pseudomonas putida* 77 酵素需要 Mg^{2+} 和 K^+ 才會有活性，活性隨金屬離子濃度升高而增加，約至 1 mM 就不再上升[Ogawa et al., 1995]; *Blastobacter sp.* A17p-4 中 Zn^{2+} 、 Ag^+ 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 會使酵素完全失去活性[Ogawa et al., 1997]; 在鼠肝方面，濃度 0.1 mM Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 對活性都沒有太大的影響[Kikugawa et al., 1994; Yang et al., 1993]; 在牛肝方面， Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 高至 10 mM 都沒影響，但是 Sn^{2+} 就完全抑制酵素活性，而加入 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 會使活性增加，若以不同濃度的螯合劑將酵素的 Zn^{2+} 移除，剩下的 Zn^{2+} 量和活性成正比[Brooks et al., 1983; Lee et al., 1986; Wallach and Grisolia, 1957]。

醯亞胺水解酵素是一嗜熱性的酵素，在許多微生物中此酵素的反應活性會隨著溫度上升而升高，整個趨勢一直到達 60 有最大活性，在 pH 7.5 的環境下 60 中反應 30 分鐘，仍有超過 90 % 的活性存在[Moller et al., 1988; Ogawa et al., 1994; Runser et al., 1990]; 在豬肝中，此酵素在 60 還相當穩定，最適的催化溫度更高達 60 以上，這對恆溫動物而言是相當特別的[Yang et al., 1993]。Dihydropyrimidinase 在生理反應上是水解 dihydrouracil 和 dihydrothymine 的酵素，但其基質特異性不高，也可以催化許多外來的受質。如在鼠肝的此類酵素就具有催化水解多種 imides 及包含 5, 6 和 7 環的 cyclic imides[Yang et al., 1993]。在我們實驗中，利用醯亞胺水解酵素的嗜熱性與廣效的基質選擇等特性，來觀察研究不同的 pH 和溫度環境下，酵素對基質特異性的影響。

結果與討論

醯亞胺水解酵素是一嗜熱性的酵素，根據圖二此酵素反應活性隨著溫度上升而增加，比原本酵素生存的活體 37 高出許多，最適反應溫度可以高達到 65 ，

而在 70 時就完全觀察不到活性，可知在 70 時酵素是呈極不穩定的狀態，無法保有酵素原有的功能。豬肝醯亞胺水解酵素的最適反應 pH 值大約為 pH 8，與其他來源的此酵素相互比較，發現此酵素的最適反應 pH 值都是位於偏鹼性的範圍[Jahnke et al., 1993; Kikugawa et al., 1994; Wallach and Grisolia, 1957]，但是 pH 值也不能超過 11，否則也是會造成酵素失活。在室溫下酵素對 pH 的穩定性範圍很廣，大約是 pH 5.5—10；但是在高溫下，酵素在 pH 9 以上就變得不穩定，到 pH 10.0 就完全失去活性，表示在高溫高 pH 值下，酵素穩定受到極大的影響，可知嗜熱性醯亞胺水解酵素受溫度的影響很大，受制於酵素本身的熱穩定性。

醯亞胺水解酵素為一廣效性的解毒酵素，不僅能水解生理反應的基質 dihydropyrimidines 也能水解許多外來物如 hydantoins, cyclic 和 linear imides[Yang et al., 1993] 和 cyclic carbonates[Yang et al., 1998]。在此我們將基質分為三大類：一類為五環的 hydantoin 及其衍生物；另一類為六環的 dihydropyrimidines 類；最後一類為具五環的 succinimide 和具有六環 glutarimide 的 cyclic imides 類。針對這三大類基質探討酵素在不同環境條件下對不同基質選擇的影響。我們先就五環 hydantoins 類而言，帶有 NH_2 -及 5,5-雙取代基的 hydantoin, 不被酵素所催化水解與許多文獻相同[Kikugawa et al., 1994; Yang et al., 1993]。而在 5-端帶有取代基衍生物之間，可以看出取代基碳數較多者推電子的力量較大造成環內共振，導致產生親核攻擊使得易被酵素水解[Yang et al., 1993]。在室溫下 hydantoin 的相對活性比帶有取代基衍生物為大，可能是因取代基立體障礙增加而造成基質無法自由進出酵素活性中心；但是將溫度升高至 60 時，不帶任何取代基的 hydantoin 之 K_m 與 V_{max} 幾乎是和 25 時相同，但是帶有取代基衍生物的 K_m 與 V_{max} 有明顯的變化，表示具有取代基的基質受溫度改變影響很大；

將溫度升高至 60 °C 時三大類基質的 K_m 、 V_{max} 也都隨著增加，尤其是以六環結構的基質最為明顯，可能是因為高溫使酵素結構變得更有彈性，讓基質變得更容易進入酵素加速催化反應。當我們改變反應溫度時(25—60 °C)，六環的 dihydropyrimidines 和 glutarimide 的 K_m 、 V_{max} 和 V_{max}/K_m 隨著溫度改變上升而快速增加，六環基質最大的反應效能可以高達到 60 °C 以上，反觀五環的 hydantoin 和 succinimide 基質 K_m 、 V_{max} 和 V_{max}/K_m 幾乎是不受溫度變化的影響，但是帶有取代基的 hydantoin 則否，同六環基質一樣受溫度改變而變化。從此可知，溫度的變化對帶有取代基基質和六環結構基質有相當大的影響。不管在何種溫度條件下(25 °C 或 60 °C)，cyclic imides 類和 hydantoins 類基質之 K_m 、 V_{max} 和 V_{max}/K_m 的 pH 趨勢圖都是相似的，但是 dihydropyrimidines 類在 25 °C 下，其 V_{max} 是隨著 pH 值上升而不斷增加；但是在高溫 60 °C 下，在 pH 9.0 時 V_{max} 就開始下降，只有 K_m 的趨勢是維持不變，使得 V_{max} 和 V_{max}/K_m 的 pH 趨勢圖和室溫 25 °C 的趨勢是不一樣的，故酵素對基質的特異性是與溫度有關的。而這三類基質的反應最適 pH 值分別是 hydantoin 類是 8.0；dihydropyrimidines 類是 9.5 及 cyclic imides 類是 8.5。而六環的 cyclic imide 和 dihydropyrimidines 具有相似形狀 K_m 的 pH 趨勢圖是呈現 U 型，而不同於五環結構的基質。而我們推測因六環 dihydropyrimidines 類基質環狀構形呈現船型具有極大的立體障礙，加上進入醯亞胺水解酵素催化中心的通道可能較小，使得具有立體障礙的基質在常溫下不易進入的催化中心；但在高溫時酵素構形會變得較有彈性，通道變得較大，較能使具有立體障礙的基質進入催化中心，而五環 hydantoin 環狀構形呈平面狀，就較不受影響，故六環 dihydropyrimidines 受溫度影響較大。總結以上所述，故我們可以結論出在不同環境條件下，基質取代基和基質環狀結構(五環或六環)對酵素的基質特異性具有相當大的影響。

參考文獻

- Bernheim, F., and Bernheim, M.L.C. (1946) The hydrolysis of hydantoin by various tissues. *J.Biol.Chem.* **163**, 683-685
- Brooks, K.P., Jones, E.A., Kim, B.D., and Sander, E.G. (1983) Bovine live dihydropyrimidine amidohydrolase: purification, properties and characterization as a zinc metalloenzyme. *Arch. Biochem.Biophys.* **226**, 469-483
- Cecere, F., Galli, G., and Morisi, F. (1975) Substrate and steric specificity of hydroypyrimidine hydrolase. *FEBS Lett.* **57**, 192-194
- Cecere, F., Marconui, W., Morisi, F., and Rappuoli, B. Ger.Pat.DE (1978) 26/5594 A1
- Dudley, K.H., Bius, D.L., and Butler, T.C. (1970) Metabolic fates of 3-ethyl-5-phenylhydantoin (ethotoin, peganone), 3-methyl-5-phenylhydantoin and 5-phenylhydantoin. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **175**, 27-37
- Dudley, K.H., and Roberts, S.R. (1978) Dihydropyrimidinase. Stereochemistry of the metabolism of 5-alkylhydantoins. *Drug Metab.Disp.* **6**, 133-139
- Jahnke, K., Podschun, B., Schnackerz, K.D., Kautz, J., and Cook, P.F. (1993) Acid-base catalytic mechanism of dihydropyrimidinase from pH studies. *Biochemistry* **32**, 5160-5166
- Kautz, J. and Schnackerz, K.D. (1989) Purification and properties of 5,6-dihydropyrimidine amidohydrolase from calf liver. *Eur.J.Biochem.* **181**, 431-435
- Kikugawa, M., Kaneko, M., Fujimoto-Sakata, S., Maeda, M., Kqwasaki, K., Takagi, T., and Tamaki, N. (1994) Purification, characterization and inhibition of dihydropyrimidinase from rat liver. *Eur.J.Biochem.* **219**, 393-399
- Lee, M.H., Cowling, R.A., Sander, E.G., and Pettigrew, D.W. (1986) Bovine liver dihydropyrimidine amidohydrolase: pH dependencies of inactivation by chelators and steady-state kinetic properties. *Arch. Biochem.Biophys.* **248**, 368-378
- Lee, M.H., Pettigrew, D.W., Sander, E.G., and Nowak, T. (1987) Bovine liver dihydropyrimidine amidohydrolase: pH

- dependencies of the steady-state kinetic and proton relaxation rate properties of the Mn(II)-containing enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **259**, 597-604
- Mazus, B., Buchowicz, J., and Bull (1967) Thermal separation of dihydroorotase and dihydropyrimidinase activities from a crude plant enzyme preparation. *Acad. Pol. Sci. Biol.* **15**, 125-126
- Moller, A., Syltatk, C., Schulze, M., and wagner, F. (1988) Stereo- and substrate-specificity of a D-hydantoinase and a D-N-carbamyl amino acid amidohydrolase of *Arthrobacter crystallopoietes* AM2. *Enzyme Microb. Technol.* **10**, 618-625
- Morin, A., Hummel, W., Schutte, H., and Kula, M.R. (1986) Characterization of hydantoinase from *Pseudomonas fluorescens* strain DSM84. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **8**, 564-574
- Ogawa, J., Kaimura, T., Yamada, H., and Shimizu, S. (1994) Evaluation of pyrimidine- and hydantoin-degrading enzyme activities in aerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **122**, 55-60
- Ogawa, J., Kim, J.M., Nirdnoy, W., Amano, Y., Yamada, H., and Shimizu, S. (1995) Purification and characterization of an ATP-dependent amidohydrolase, N-methylhydantoin amidohydrolase, from *Pseudomonas putida* 77. *Eur. J. Biochem.* **229**, 284-290
- Ogawa, J., Soong, C.L., Honda, M., and Shimizu, S. (1997) Imidase, a dihydropyrimidinase-like enzyme involved in the metabolism of cyclic imides. *Eur. J. Biochem.* **243**, 322-327
- Runser, S., Chinski, N., and Ohleyer, E. (1990) D-p-hydroxyphenylglycine production from DL-5-p-hydroxyphenylhydantoin by *Agrobacterium* sp.. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 382-388
- Runser, S.M., and Meyer, P.C. (1993) Purification and biochemical characterization of the hydantoin hydrolyzing enzyme from *Agrobacterium species*: a hydantoinase with no 5,6-dihydropyrimidine amidohydrolase activity. *Eur. J. Biochem.* **213**, 1315-1324
- Sobotka, H., U.S. Pat. 1. (1932) **861**, 458
- Su, T.M., and Yang, Y.S. (2000) Identification, purification and characterization of thermophilic imidase from a pig liver. *Protein Expr. Purif.* **19**, 289-297
- Syltatk, C., Laufer, A., Muller, R., and Hoke, H. (1990) Production of optically pure D- and L- amino acids by bioconversion of D,L-5-monosubstituted hydantoin derivatives. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **41**, 29-75
- Wallach, D.P., and Grisolia, S. (1957) The purification and properties of hydroxyimidine hydantoinase. *J. Biol. Chem.* **226**, 277-288
- Williams, R.M. (1989) Synthesis of optically active α -amino acids Pergamon Press, New York, USA
- Yamada, H., Shimizu, S., Shimada, H., and Tani, Y. (1980) Production of D-phenylglycine-related amino acids by immobilized microbial cells. *Biochimie.* **62**, 395-399
- Yang, Y.L., Ramaswamy, S., and Jakoby, W.B. (1998) Enzymatic hydrolysis of organic cyclic carbonates. *J. Biol. Chem.* **273**, 7814-7817
- Yang, Y.S., Ramaswamy, S., and Jakoby, W.B. (1993) Rat liver imidase *J. Biol. Chem.* **268**, 10870-10875