

第三章 結果與討論

3-1 酵素之表現與純化

在本實驗室先前的研究中，曾經將 α -L-arabinofuranosidase 基因轉殖到大腸桿菌系統中，其表現出之蛋白質為包涵體 (inclusion body)，皆無法呈現活性。後來將此基因利用酵母菌系統 *Pichia pastoris* 表現，成功得到大量表現的胞外酵素。本論文延續之前的研究，所有突變株繼續沿用 *P. pastoris* 表現系統。

將基因轉殖至 *P. pastoris* 系統中，目標基因是插入宿主細胞的染色體 DNA 中，所以不能以純化質體 DNA (plasmid) 方法確認轉殖結果，因此利用單一菌落 (single colony) PCR 的方式篩選轉殖成功的菌落。但是，即使挑選到確定有目標基因的菌落進行誘導，也會因為目標基因在生物整個基因組 (genome) 中，佔有的個數 (copy number) 不同而表現量不同，也因此需要利用活性測試或蛋白質電泳，再做進一步的篩選。最後再針對效率最好的菌落作大量誘導。以下簡述各確認步驟及蛋白質表現與純化之結果

3-1-1 single colony PCR 確認電送法轉型

對電送法轉殖後的菌落挑數顆個別使用 colony PCR 作確認，以挑選適當菌落誘導。 α -L-arabinofuranosidase gene 大小約 1.4 kb，若以 5'-D95N (5'-CTCATTACCATCATATACAACCAGTC GG-3') 及 3'-D490N (5'-GCTCACGTTGTCGTTGAAAGCG-3') 為 primer 則其放大的基因大小約 1.2 kb，圖 3-1 是經轉殖後之單菌落以 colony PCR 的結果，由圖可知在五株單菌落中除 Lane 3 者外，其餘菌株中均含有 *abf* 基因，這些含有 *abf* 基因之菌落將進一步被誘導產生 α -L-arabinofuranosidase (ABF)，其表現量或以活性分析或利用蛋白質電泳法比較之。

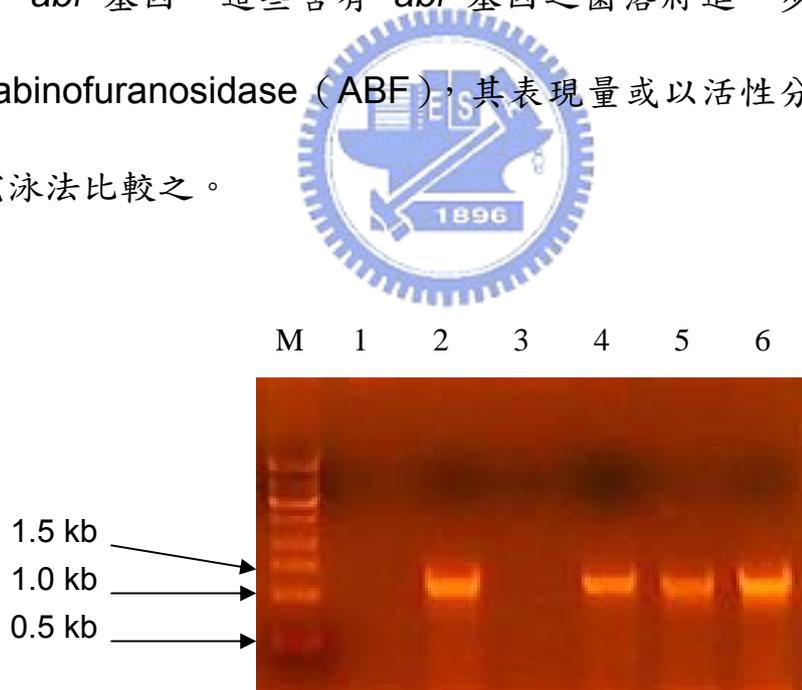


圖 3-1： single colony PCR 電泳圖。Lane M, marker. Lane 1, only GS115 competent cell. Lane 2~6, single colony. (圖以 E223G 突變株為例)

3-1-2 篩選最佳菌落

由於 *pichia* 表現系統中菌株所攜之基因份數常受轉殖條件影響，因此每一攜有目標基因的菌落，其蛋白質表現量不盡相同，而 PCR 僅能提供是否已成功轉殖之訊息。對於蛋白質之表現量的部分則有賴活性分析或蛋白質電泳作為判斷。有活性的酵素（如 wild type、E223G），可以直接取醱酵液偵測活性，便可比較其表現量的差異。對於活性較差的酵素，就直接取醱酵液進行蛋白質電泳分析。成功的轉殖與誘導可以使蛋白質之表現量有明顯之差異，如圖 3-2 (A)所示，E223G 和 E223G/D299N 之表現效率即較 E223G/D191N 高出甚多，前兩者均可於 1 L 醱酵液中得到 16~27mg 之蛋白質。事實上如何有效利用 *pichia* 系統大量生產目標蛋白質，本身即是生物技術領域中一重要的研究課題。在本研究中，我們成功的利用此系統生產了 E223G、D191N、E223G/D191N、E223G/D191N 與 E223G/D299N 共 5 株 ABF 突變酵素，以進行後續之研究。

3-1-3 阿拉伯呔喃糖苷酵素的表現

本研究之 *abf* 基因和突變基因共六株，是以 pICZ α B 載體植入 *pichia* 系統中。pICZ α B 是利用 AOX1 promoter 操作系統，故須以甲

醇誘導製造 ABF。以本研究之誘導過程而言，較佳之條件為每隔 24 小時加一次甲醇，並隨時間取樣觀察活性，其適當誘導時間為 120 小時。由圖 3-2 (A) 可以看到酵素的大量表現。將醱酵液離心收集後，取上層液以 80%飽和度之銨鹽沉澱，可得到粗蛋白沉澱物，再以 20 mM 醋酸銨，pH 4.1 緩衝液回溶該沉澱物進行蛋白質電泳分析，結果如圖 3-2 (B) 所示，經此銨鹽處理之酵素樣品可提升至約 90%均質性。為因應動力學之研究，高純度酵素是必然的要求，因此上述樣品將再以管柱層析做進一步純化。

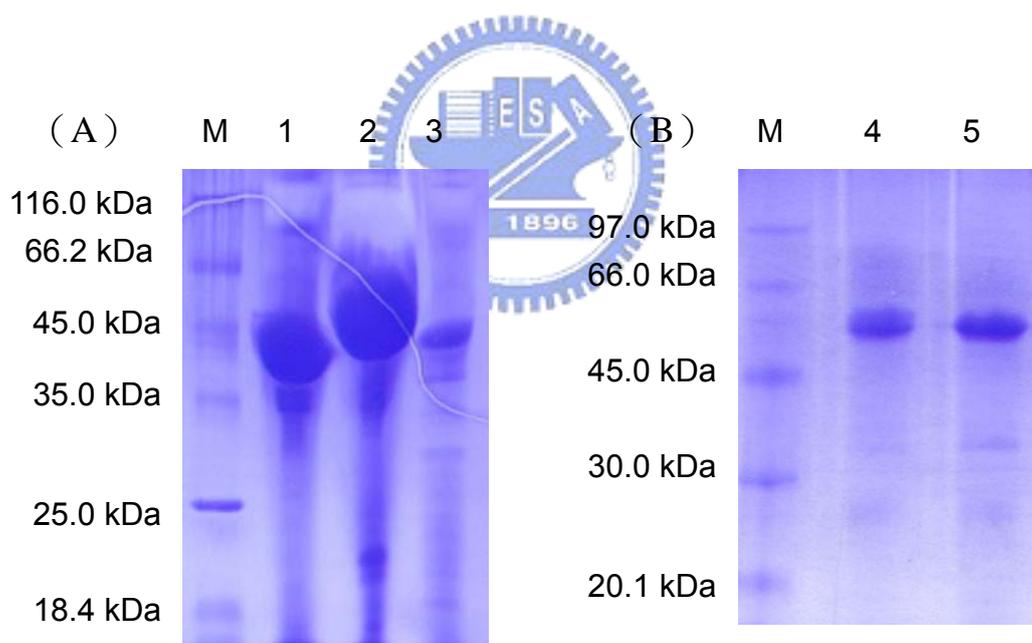


圖 3-2：酵素的蛋白質電泳圖。(A) lane M, protein marker. lane 1, E223G. lane 2, E223G/D299N. lane 3, E223G/D191N. (B) lane 4, E223G/D191G. lane5, WT.

3-1-4 酵素的純化

各突變酵素與 wild type 純化方式均大同小異，除前述之前處理外，粗蛋白液再經過 SP（陽離子交換樹脂）管柱層析（程式如圖 3-3）。約在 80~150 mM NaCl 的鹽類濃度下，可將 ABF（伴隨著一些色素分子）沖提出來，因色素為較小之分子，故利用高速旋轉濃縮瓶（viva spin 10 kDa）以緩衝液多次濃縮與置換則可除去色素。經由這些步驟可以使酵素純度進一步的提升，由 SDS page（圖 3-4）分析得知純度可達 95% 以上，分子量大小約為 50 kDa。

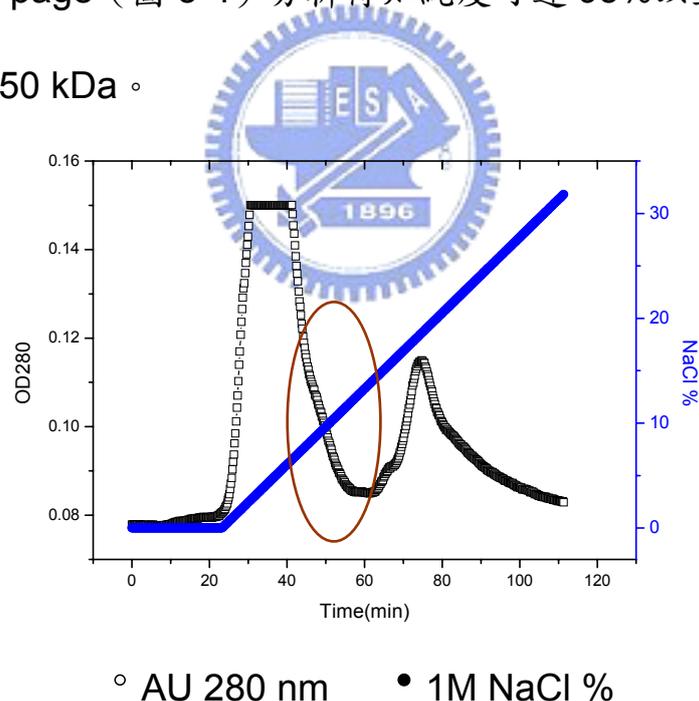


圖 3-3：wild type 及各突變株酵素之 SP 管柱層析圖，ABF 均出現在 40~70 min 此區間。

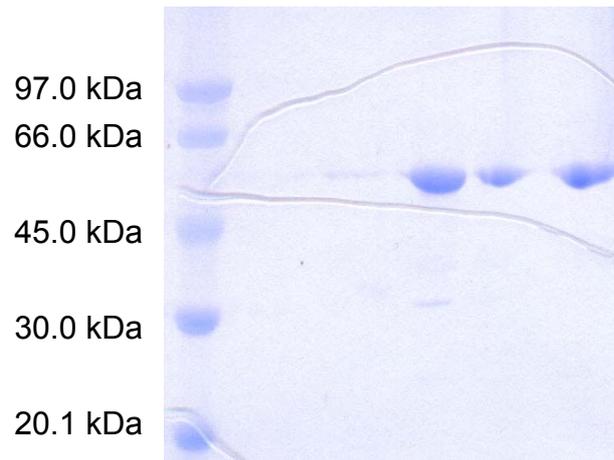


圖 3-4： α -L-arabinofuranosidase 經管柱層析純化後之蛋白質電泳分析，圖以 E223G/D191N 酵素為例。



3-2 再確認 D299 在催化反應的角色

在先前本實驗室的研究中，已對D299G及D299N突變酵素進行動力學研究，而D299G及D299N相對於wild type活性下降約 120-150 倍。此外也對wild type及D299G進行受質特異性研究，並利用Brønsted Plots求得其 β_{1g} 分別為 -0.18 和-1.3，這些數據均顯示都是D299 在wild type中扮演一般酸/鹼基之角色⁽¹⁹⁾。

在本論文中，我們亦利用溶劑同位素效應 (solvent isotope effect) 對D299 之功能進行驗證。結果如表 3-1 所示，比較wild type及D299G在不同溶劑 (H₂O與D₂O) 系統之 k_{cat} / K_m 值可以發現，對wild type而言，在H₂O與D₂O的環境中並不影響其催化速率，但是D299G則有明顯差異。D₂O比H₂O較難解離，因而在沒有一般酸的情況下，溶液中的水會參與催化過程幫助受質離去基離去，也更強化wild type催化過程中D299 是一般酸的角色。

表 3-1：wild type及D299G之同位素效應結果 (25°C, 100 mM CH₃COONa buffer)

	Wild type	D299G
Active ratio (H ₂ O/D ₂ O)	1	3

3-3 Wild type 與 E223G 之 pH-profile 的比較

醣苷水解酵素之催化通常有兩個羧酸類之胺基酸殘基如 Asp 或 Glu，而其 pH-profile 常呈現鐘形曲線，此等曲線反應出二羧酸之 pK_a ，以 WT ABF 為例其 pH-profile（如圖 3-5）則由 $pK_{a1}=1.8$ 和 $pK_{a2}=5.15$ 所操控。前者是代表親核基（E223）之 pK_a 而後者則屬一般酸/鹼基（D299）之 pK_a ，然而 E223 被突變為 G223 時（即突變酵素 E223G）其催化仍然屬於鐘形曲線（如圖 3-6），其 $pK_{a1}=1.6$ 和 $pK_{a2}=3.9$ ，其催化反應仍有兩個胺基酸參與。為進一步了解此二胺基酸為何，我們將活性區內之可能胺基酸殘基（D191 和 D299）進行雙點突變，並進行深入之動力學分析。

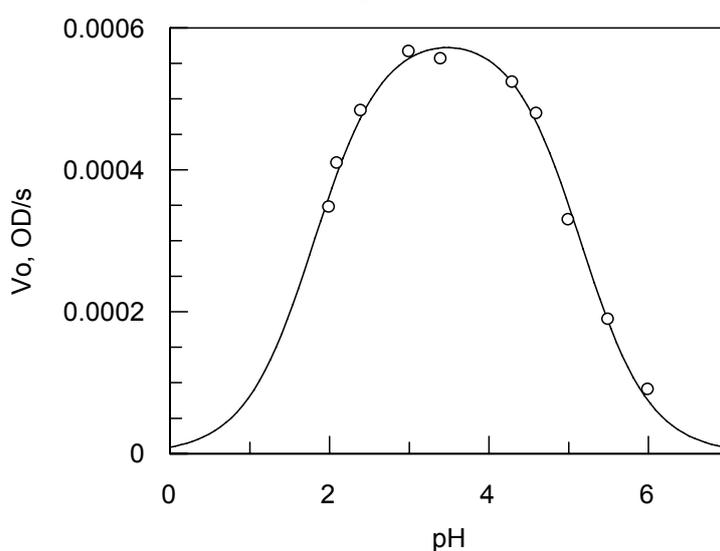


圖 3-5：wild type 酵素在各 pH 值中的活性變化

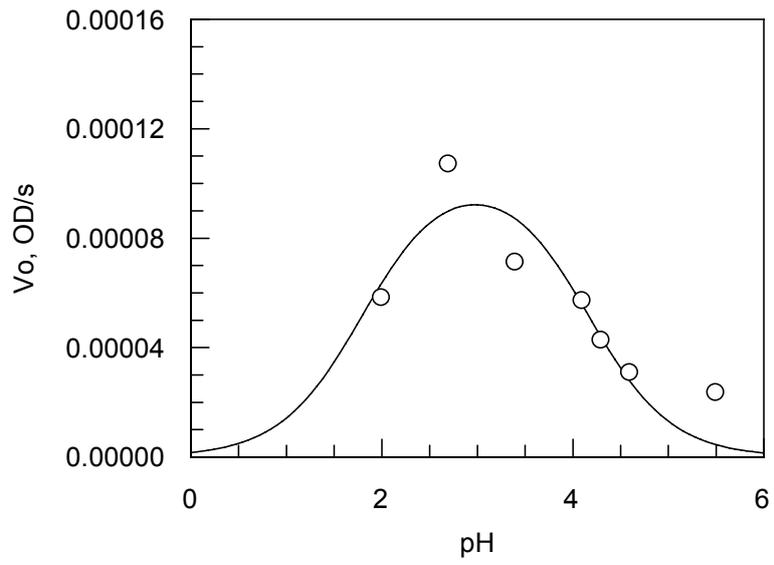


圖 3-6：E223G 酵素在各 pH 值中的活性變化



3-4 E223G 之轉糖研究

在我們過去的研究中，WT ABF 具有很好的轉糖特性，當 WT ABF 在含有 10-20% 之甲醇中進行 pNPAF 之水解反應，我們可在反應產物中同時發現阿拉伯糖和甲基- α -L-阿拉伯呔喃糖苷 (α -L-MAF) 存在，而 α -L-MAF 的存在表示酵素之催化為二步驟雙取代反應，第一步驟進行酵素之糖基化而形成 arabinofuranosyl-enzyme 中間體，第二步驟則以水或甲醇進行去糖基反應，因產物之 anomeric configuration (α -L-) 與反應物者相同，故知其為兩步驟之反應。因此利用甲醇之轉糖實驗，可同時證實酵素反應機構之型態與是否具備轉糖之特性。相反的若酵素不具備有轉糖反應，則可能屬於單步驟取代之構型反轉反應。

我們嘗試在各種不同甲醇濃度和不同溫度下進行 E223G 轉糖反應，但始終偵測不到 α -L-MAF 之生成，因此初步判斷 E223G 可能屬於構型反轉機制。檢視 ABF 結構之活性區，可發現 D191 與 D299 相距 7.5Å，若此二胺基酸是 E223G 催化反應之重要殘基則催化應屬反轉之機制。(圖 3-7)

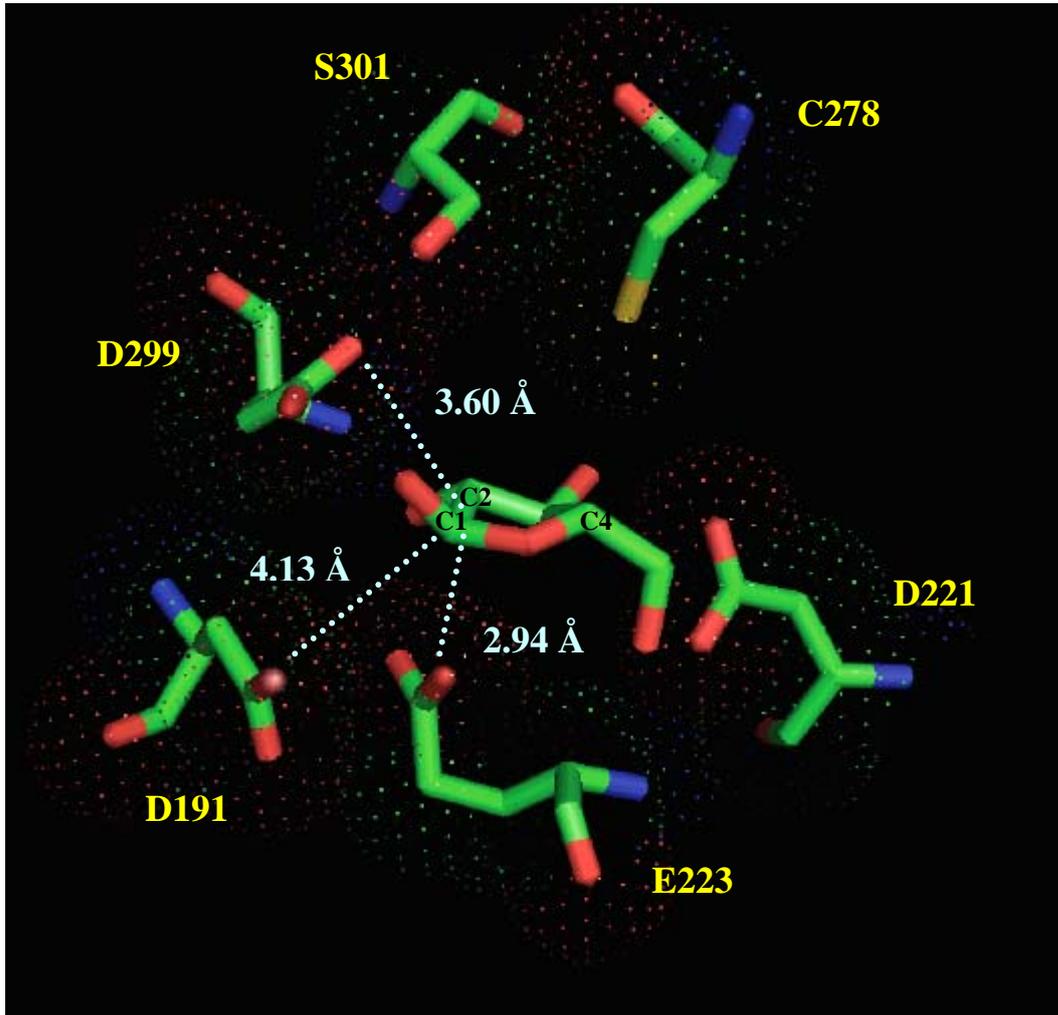


圖 3-7： α -L-arabinofuranosidase 分子模擬

3-5 突變酵素之活性分析

由圖 1-9 之活性區可見D191 與D299 是最可能於E223G中扮演重要催化功能之胺基酸，我們利用定點突變技術完成如表 3-2 所列之各突變酵素，動力學分析其催化反應的結果表列如表 3-2。所有酵素動力常數是利用雙倒數作圖法分析(如圖 3-8)。由表 3-2 可見突變酵素除D299N和D191G/E223G之 K_m 值為 0.05 和 2.05 mM外，其於突變酵素之 K_m 值大略相似(約 0.2 mM)，顯示此等突變酵素對反應受質仍具備類似之辨識能力。D299N之 K_m 值下降表示其催化反應中有中間體累積，這是移除一般酸/鹼基之後經常出現的現象。主因是D299N催化反應速率步驟為去糖基化步驟，因此造成酵素催化中間體的累積。而

$$K_m = \frac{[E][S]}{\Sigma [ES]}$$

當ES增加則 K_m 必然下降，而

E223G/D191G之 K_m 值上升至 2.05 mM可能導因於其結構上之變化。由活性之比較可發現當E223G酵素中之D191 被突變為G或N時(即E223G/D191G, E223G/D191N)其活性(k_{cat}/K_m)下降約 20-150 倍，而E223G/D299N之活性下降約 35 倍。這些活性變化量雖不明顯，但仍不能排除D191 和D299 在E223G酵素催化反應中扮演重要的角色。

為進一步探討 D191 和 D299 之角色，我們對上述雙點突變酵素

進行 pH-profile 的分析。

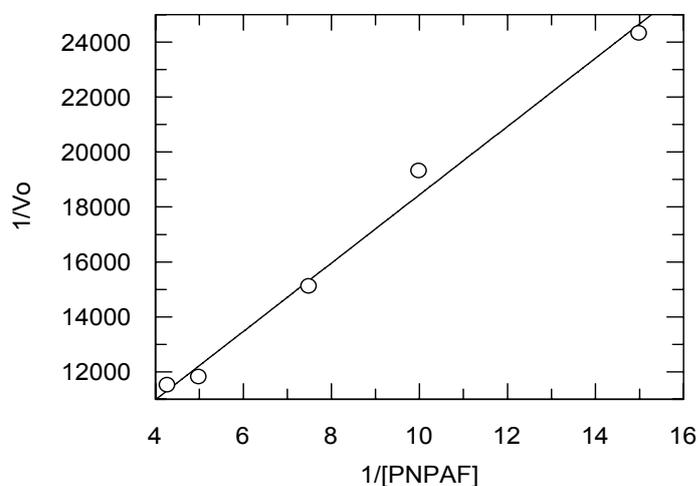


圖 3-8：以雙倒數作圖法求E223G酵素對pNPAF之 K_m 、 k_{cat}

($[E]=0.316$ mg/ml, 30°C 100 mM, pH4.1)

表 3-2：wild type 和各突變株酵素活性之比較

Apparent Activity of Mutants against pNPAF					
enzyme	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	$r_{k_{cat}}$ (%)	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$r_{k_{cat}}/K_m$ (%)
wild type	0.23	11.57	100	48973	100
D191N	0.42	10	86.43	23928	49
D299G ⁽¹⁹⁾	0.21	0.08	0.69	400	0.81
D299N ⁽¹⁹⁾	0.05	0.016	0.14	320	0.65
E223Q ⁽¹⁹⁾	0.88	0.0005	0.004	0.57	0.0011
E223G	0.21	0.44	3.8	2123	4.3
D191N/E223G	0.23	0.029	0.25	97.5	0.2
D191G/E223G	2.05	0.03	0.26	14.53	0.03
E223G/D299N	0.26	0.016	0.14	60.12	0.12

3-6 E223G/D191G 和 E223G/D299N 之 pH-profile 研究

如前述，一般糖苷水解酵素之催化反應由兩個重要羧酸胺基酸所調控，其pH-profile呈現鐘形曲線之特性，因此若其中之胺基酸因突變而喪失其解離之特性，則其pH-profile將呈現單一 pK_a 調控之s-形曲線，如圖 3-9，E223G/D191G之pH-profile呈現這樣的特徵，顯示E223G/D191G之 $pK_{a2}=5.56$ 沒有 pK_{a1} ，因此其應該具有一般鹼之功能。我們亦將E223G/D299N做pH-profile研究，發現其也是s-形曲線， $pK_{a1}=2.23$ ， pK_{a2} 已不存在（圖 3-10），可見其應該具有一般鹼之功能。

然而此二雙點突變酵素之 pK_a 與WT ($pK_{a1}= 1.8$, $pK_{a2}= 5.15$) E223G ($pK_{a1}= 1.62$, $pK_{a2}= 3.91$) 明顯不同，這可能是因為突變酵素之結構引起變化所致。

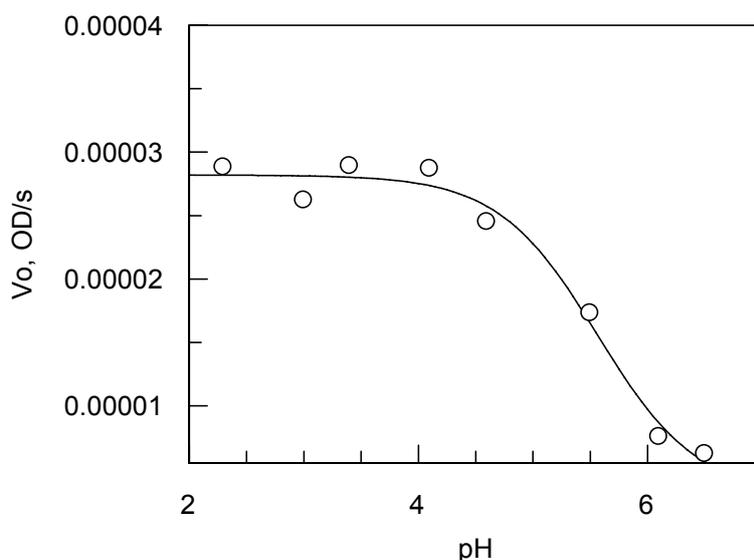


圖 3-9 : D191G/E223G 酵素在各 pH 值中的活性變化

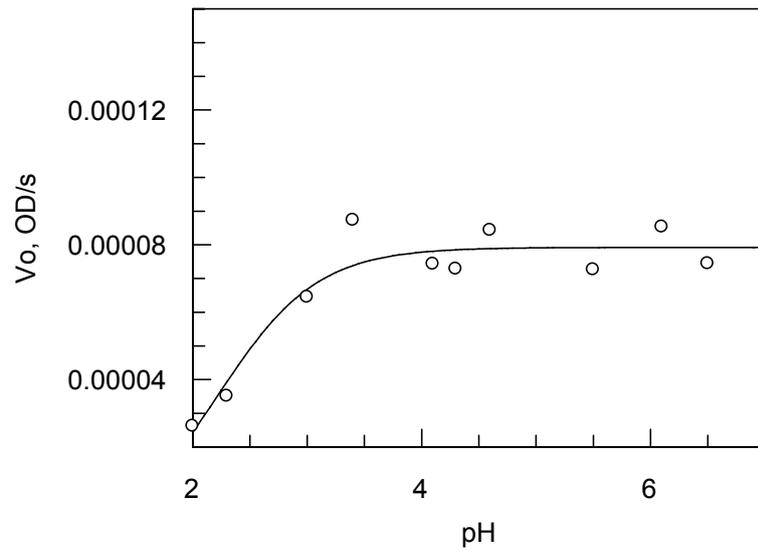


圖 3-10 : E223G /D299N 酵素在各 pH 值中的活性變化



3-7 CD 光譜研究

為進一步了解突變酵素是否造成結構上的差異，我們以CD光譜分析WT, E223G, E223G/D191G和E223G/D299N之二級結構，結果如圖 3-11 所示。WT之CD圖與其他突變酵素有比較明顯的差異，而突變酵素彼此間的差異則較不明顯。CD雖未能提供明確之訊息，但WT與突變酵素之間似乎結構有所不同，而這些結構差異可能是造成 pK_{a1} 與 pK_{a2} 在各突變酵素有些微差異。(表 3-3)

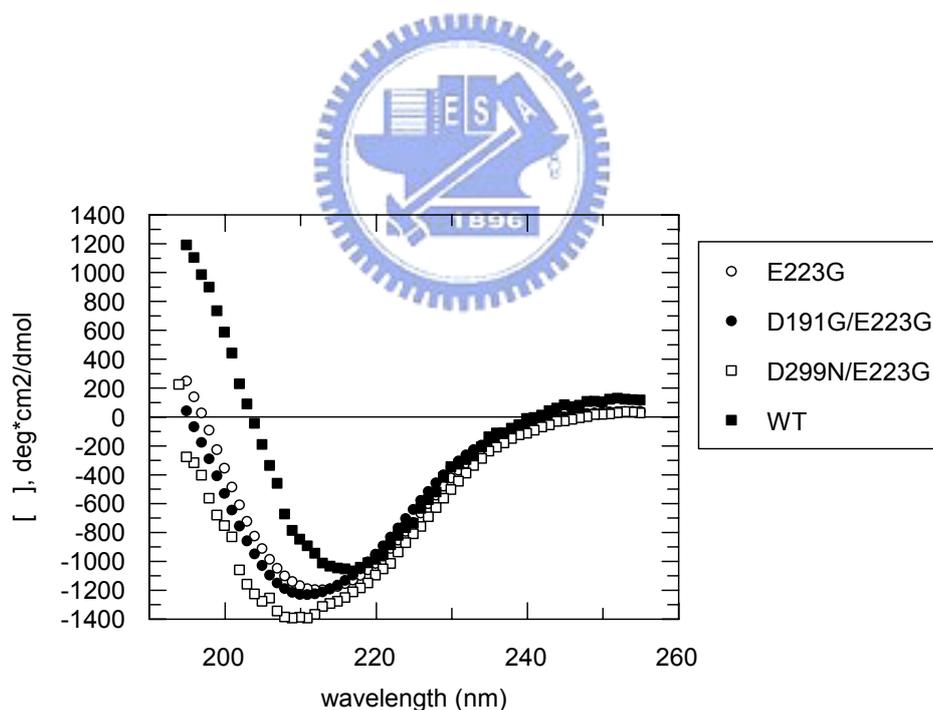


圖 3-11：wild type 與 E223G/D191G、E223G/D299N 和 E223G 之 CD 光譜。

表 3-3 CD 程式分析二級結構

	WT (%)	E223G (%)	E223G/D191G (%)	E223G/D299N (%)
α -Helix	38.3	13.8	9.0	8
β -Sheets	29.7	46.3	53.1	49.4
Turn	10.6	7.2	5.6	5.9
Random	21.4	32.8	32.3	36.7



3-8 阿拉伯呋喃糖苷酵素反應機制的探討

經由 *Aspergillus kawachii* IFO4308 與 *Trichoderma koningii* G-39 α -L-arabinofuranosidase 蛋白質序列之比對 (附錄四), 其相同度 72%, 表示兩者幾乎是相同的酵素。比對 *Aspergillus kawachii* IFO4308 α -L-arabinofuranosidase 的結晶結構後, *Trichoderma koningii* G-39 α -L-arabinofuranosidase 的分子模擬分析 (圖 3-12) 應頗具真實性, 由圖 3-12 清楚看到在活性區內 D191 和受質 C1 距離 4.13 Å, 將 E223 突變為 glycine 後此距離正可以讓水分子進入, 而使反應改走反轉機制 (圖 1-6)。而此推論除了立體結構的支持以外, 還有酵素動力學數據、活性與 pH 值關係, 得到更明確的結論。另外, 由結構模擬圖發現 D191 和糖的 C1 位置 4.13 Å, 若將 D191 突變為 glutamic acid 比原本的 aspartic acid 多一個碳, 則 D191 和糖的 C1 位置距離會更接近約 1.4 Å, 則 E223G/D191E 將有可能又回到保留機制的反應途徑, 此假設仍有待後續實驗之證實