中 国 科 学 (B 辑)
第23卷 第9期 SCIENCE IN CHINA (Series B) 1993年9月

高专一性胰蛋白酶突变体的分子设计*

来鲁华 王彦力 徐筱杰** 唐有祺
(北京大学化学系,北京 100871)
倪逸声 张龙翔
(北京大学生物系,北京 100871)

摘 要

本文对于改变胰蛋白酶专一性的方法进行了研究,通过对胰蛋白酶静电性质的计算找到了一种改变表面碱性氨基酸来达到使酶选择性地与精氨酸底物反应的途径,并给出了推荐的突变体表列.

关键词 高专一性胰蛋白酶、分子设计、静电性质计算

胰蛋白酶是生物体中的一种极为重要的酶,属于丝氨酸蛋白酶家族,凝血过程[1]及补体结合[2]中许多高专一性酶也属于这一家族,这些复杂的酶中均包含有一个类似于胰蛋白酶的活性中心[3],它们的催化机制也很相似. 关于胰蛋白酶及其它丝氨酸蛋白酶的结构与功能的研究构成了现代酶学的重要组成部分. 本研究的目的在于改变胰蛋白酶的反应专一性,使其能够高度选择地只与赖氨酸或精氨酸类型的底物反应. Craik 等人曾试图以改变专一性口袋内部残基的方式来改变胰蛋白酶的专一性,结果不尽人意,虽然选择性有所提高,但酶的活性大大下降[4]. 我们致力于寻找一种能够改变胰蛋白酶的专一性,同时又尽可能保持其活性的分子设计方案. 对于这样一种在理论上及实际应用上都有价值的酶进行分子设计无论是对于更深入地研究酶的作用机制,还是对于实际应用均有意义.

1 提高胰蛋白酶反应专一性的两条途径

丝氨酸蛋白酶具有一个共同的空间骨架,其催化机制也很保守[3],但各种酶的反应专一性大不相同,这种反应的专一性不同可能是由于各个酶参与底物专一性结合的氨基酸不同而造成的[4]. 胰蛋白酶在专一性口袋底部有带负电荷的残基 Asp 189,能与碱性氨基酸 Lys 或 Arg 侧链发生相互作用.

1992-04-06 收稿,1993-01-06 收修改稿.
* 国家"863"高科技资助项目.
** 联系人.

我们对胰蛋白酶进行分子设计的目的就是使其能够选择性地只与 Lys 或 Arg 底物反应，而不是同时与两类底物反应．为了达到这一目的，可以从两个方面进行分子设计．

(1)基于参与底物结合的氨基酸残基的不同导致了各类丝氨酸蛋白酶结构及反应机理相同但反应专一性却大不相同的事实，通过改变专一性口袋中的残基而达到使酶只与 Lys 或 Arg 一种底物反应的目的．从 Craik 等人的工作[4]可以知道改变专一性口袋内的残基虽然可以部分地提高胰蛋白酶的专一性，但由于酶的活性随之下降很多因而没有实际意义．

(2)分析底物本身的差异，着重研究与专一性口袋结合的 Lys 或 Arg 侧链结构与性质的不同．通过分析、比较发现 Lys 与 Arg 有一个很大的不同就是其侧链的 pK_a 要相差 2 个 pH 单位．而两个侧链均需要以质子化的形式与胰蛋白酶的疏水性口袋结合．假如能够在 Arg 侧链质子化而 Lys 侧链非质子化的条件下(pH＝10.5—12.5 之间)进行反应，那么将会提高酶对 Arg 底物的选择性．但是胰蛋白酶反应的最适 pH 在 7.6—8.0 左右，到 pH＝10 时的活性已经很低了，因此改变专一性的问题就变成了设计一种能够在高 pH 下保持活性的胰蛋白酶的问题了．

综合以上分析通过改变胰蛋白酶表面碱性残基提高胰蛋白酶反应的最佳 pH 的方法来达到提高其对精氨酸类底物的选择性应该是一种可行的方案．

2 提高胰蛋白酶反应的最佳 pH

从胰蛋白酶的反应机制可以知道 His(57) 的解离情况在胰蛋白酶的反应中起到了决定性的作用[3]．反应 pH 过低，His(57) 的咪唑环大部分处在质子化状态，难以起到输送质子的作用；pH 过高，咪唑环则采取中性的稳定态，难以与质子结合，也起不到输送质子的作用；在 pH 等于 His(57) 侧链的表观 pK_a 时，将有等量的 His(57) 咪唑环处在质子化及非质子化状态，此时的 pH 应反映了酶反应的最适 pH．因此通过改变 His(57) 侧链表观 pK_a 的方法就可以达到改变反应最适 pH 的目的．

His(57) 侧链的表观 pK_a 受环境的影响而发生变化．若要改变 His(57) 的周围环境，又不使酶的结构发生变化以保证反应的进行，改变酶分子表面的极性残基是一个很好的方法．由于表面荷电残基对 His(57) 有静电屏蔽作用，改变原有荷电残基的电性就可以显著地影响 His(57) 的表观 pK_a．从以下的计算可以看出将胰蛋白酶分子表面的碱性残基换为中性或负电荷残基可以提高酶反应的最适 pH.

2.1 提高酶促反应的最适 pH 对胰蛋白酶选择性的定量影响

我们已经定性地知道提高反应的 pH 将会使胰蛋白酶更选择性地与 Arg 反应．通过一些简单的计算可以对酶反应选择性的改变进行定量的描述．

以 K_a 代表解离反应的表观电离常数．

赖氨酸侧链 $pK_a=10.5$　　精氨酸侧链 $pK_a=12.5$

$Lys\text{-}H^+ \rightleftharpoons Lys + H^+$　　$Arg\text{-}H^+ \rightleftharpoons Arg + H^+$

$K_{aLys}=[H^+]*[Lys]/[Lys\text{-}H^+]$, $K_{aArg}=[H^+]*[Arg]/[Arg\text{-}H^+]$.

比较等量底物浓度下胰蛋白酶的选择性，并且假定底物的表观解离常数与理论值接近，因此可得

$$[Lys\text{-}H^+]+[Lys]=[Arg^+]+[Arg]$$
$$=(10^{-10.5}+[H^+])/(10^{-12.5}+[H^+])$$

表 1

$[Arg\text{-}H^+]/[Lys\text{-}H^+]$	1	2.0	10.0	50.0	100
pH	$\ll 10.5$	10.5	11.5	12.5	$\gg 12.5$

通过提高反应 pH 的办法提高胰蛋白酶对 Arg 的选择性，所能达到的倍数随反应的 pH 而变化，最大可达 100 倍(表 1)．但是通过突变的方法将胰蛋白酶的反应最适 pH 提高到 pH＞13 以上很困难，因此实际所能达到的倍数可能在 2— 50 之间．

2.2 筛选可能的突变体

为了便于研究突变位点对 His(57) pK_a 的影响，我们利用可以给出蛋白质静电计算解析式的 Kirkwood 方法[5] 对牛胰蛋白酶及鼠胰蛋白酶进行了计算．通过单位体积内的原子密度分析[6] 确定胰蛋白酶的分子半径为 2.3nm, His(57) 与分子中心的间距为 0.90nm.

首先对表面突变体的位置与 His(57) pK_a 改变的关系进行了研究，得到了单点突变体(碱性残基→酸性残基)的位置对牛胰蛋白酶 His(57) pK_a 影响的两张图，见图 1, 2. 从图 1 可以看出 pK_a 的改变随角 $\theta(-180, 180)$ 绝对值的增大而迅速减小，最后趋于一个定值，在 $\theta=70°$ 时 pK_a 的变化已降为 0.4. 图 2 是 pK_a 的改变随突变残基与 His(57) 的间距而变化的图，pK_a 的改变也呈单调下降趋势．选 $\theta<70°$ 做为胰蛋白酶突变体的筛选标准．

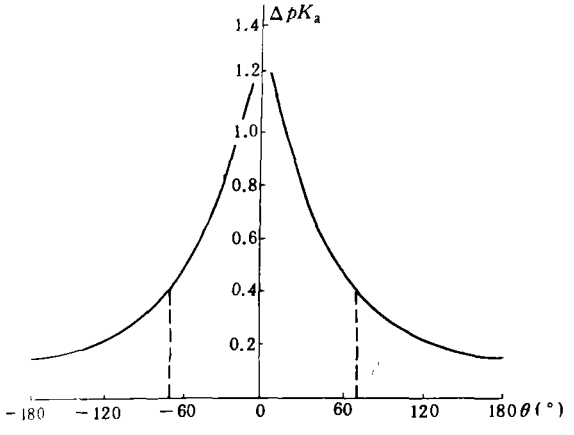

图 1　胰蛋白酶中组氨酸(57)的 pK_a 随突变位点与组氨酸(57)对蛋白中心夹角的变化

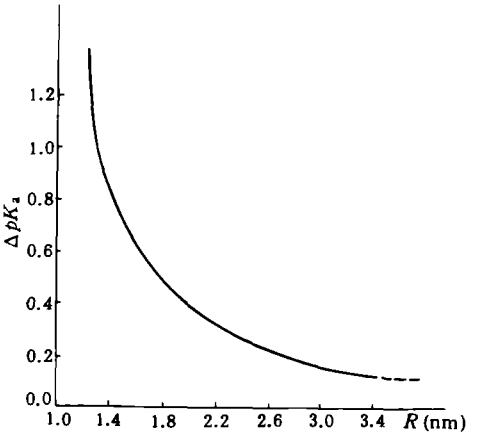

图 2　胰蛋白酶中组氨酸(57)的 pK_a 随突变位点与中心距离的变化

表 2　突变前后胰蛋白酶 57 位组氨酸 pK_a 的变化

鼠胰蛋白酶(采用糜蛋白酶氨基酸顺序编号):				
	θ	ΔpK_a		ΔpK_a
ARG(62)→ GLU(62)	60.8	0.47	→ SER(62)	0.23
ARG(96) → GLU(96)	26.0	0.93	→ SER(96)	0.46
LYS(97) → GLU(97)	25.1	0.94	→ SER(97)	0.47
LYS(175) → GLU(175)	47.2	0.62	→ SER(175)	0.31

我们根据鼠胰蛋白酶各表面碱性残基相对于 His(57) 的位置筛选出位于 70° 圆锥内的4个突变位点，分别为 Lys(97), Arg(96), Lys(175), Arg(62). 距离最近的两个碱性残基变为酸性残基后可以使 His(57) 的 pK_a 提高近一个 pH 单位(表 2).

3 讨 论

我们通过静电计算找到了四个表面碱性残基位点: Lys(97), Arg(96), Lys(226), Arg(62). 但具体选择突变残基时除了考虑实验上的便利以外，还需考虑如何尽可能地避免引起酶分子整体结构发生大的变化. 由于丝氨酸蛋白酶类的分子结构保守，因此可以先通过序列对比确定同一个位置上自然界已经选用的残基有哪些，然后根据这个允许表来选择突变方案，这种方法可以尽可能地避免突变后酶的活性发生大的改变. 表面突变残基的选择可参照表 3 进行.

表 3

	62	96 97	175
rat-trypsin (2)	S R C	D R K T	G K I T
bovine-trypsin	S G I	N S N T	G Q I T
pig-trypsin	S R I	N G N T	G Q I T
rat-trypsin (1)	S R I	S S W T	G E I T
dog-trypsin	P R Y	N A N T	G Q I S
dogfish-trypsin	R R I	S G Y D	M I T N
crayfish-trypsin	G D D	D Y D L	D E I F
chymotrypsin	T T S	N S L T	T K I K
elastase	R E L	N T D D	S T V K

表 4 推荐的鼠胰蛋白酶突变体表列

Arg 底物高选择性突变体
Arg(62) → Thr, Asp
Arg(96) → Ser
Lys(97) → Asp
Lys(175) → Glu

推荐进行实验制备的突变体列于表 4. 可按表 4 进行单点突变，也可同时进行多点突变. 有关的实验工作正在进行中.

参 考 文 献

[1] Davie, E. W., Fujikawa, K., *Annu. Rev. Biochem.*, 1975, **44**:799.
[2] Eberhard, H. J. M., *Annu. Rev. Biochem.*, 1975, **44**:697.
[3] Scheiner, S., Lipscomb, W. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1976, **73**:432.
[4] Craik, C. S., Largman, C., Fletcher, T. *et al.*, *Science*, 1985, **228**:291.
[5] Tabford, C., Kirkwood, J. G., *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, **79**:5333.
[6] Bashford, D., Karplus, M., *J. Mol. Biol.*, 1988, **203**:507.