

蛋白质去糖基化酶及其应用

刘慧敏 印大中

(湖南师范大学生命科学学院 湖南 长沙 410081)

摘要:果糖氨氧化酶和果糖氨激酶能催化去糖基化反应而释放出自由氨基。本文主要探讨阿马多里酶的生物化学特征。如结构和功能的关系,动力学机制和底物的特异性,并探讨这些酶的生物作用和在蛋白中去糖基化中的应用,希望为糖基化相关疾病的治疗提供很好的治疗手段。

关键词:去糖基化酶;阿马多里酶;衰老

中国分类号:Q55 **文献标识码:**A

Deglycosylation enzyme of proteins and its application

LIU Hui - min, YIN Da - zhong

(College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hu'nan, China)

ABSTRACT: Fructosyl lysine oxidase and fructose lysine 3 - phosphokinase can catalyze the deglycosylation reaction and generate free amino groups. This paper reviews the biochemical properties of these "amadoriase" enzymes, such as structural - function relationship, kinetic mechanism, and substrate specificity, as well as their biological roles and applications in the protein deglycosylation, which is expected to offer a promising therapeutic approach for the prevention and treatment of glycosylation related diseases.

Key words: Deglycosylation enzyme; Amadoriase; Aging

前言

美拉德反应又称非酶糖基化反应,是自然界中最普遍的毒性生化副反应之一。反应步骤大体为,某些还原性糖如葡萄糖与氨基酸或蛋白质上的 α -或 ϵ -氨基结合先形成不稳定的薛夫碱,该物质经过重排再形成稳定的酮氨产物即阿马多里产物,然后通过脱氢和裂解反应形成更加稳定的化合物或交联产物-高级糖基化终端产物(AGEs)^[1]。AGEs的增加与许多老年慢性疾病如动脉粥样硬化,糖尿病,关节炎,神经退行性疾病等都有一定的联系。而且近年来,越来越多的证据表明AGEs的增加会引起衰老和某些疾病。而在美拉德反应过程中形成的最初稳定产物是阿马多里产物。阿马多里产物与晶状体蛋白和其他蛋白构象的改变都有关系。其中有些产物不仅可以进一步形成具有生物活性的氧化产物而且也是AGEs的一种前体物质^[2]。

然而相关研究表明,AGEs的形成并不是非酶糖基化必然的结果。因此,糖基化级联反应的抑制剂的研发将对衰老或者相关疾病的预防产生深远影响。现已发现了一系列化合物具有该作用。这些化合物可以在糖基化级联反应的不同阶段进行干预,其中某些抑制剂还可以在多个层次上发挥作用,例如氨基胍和吡哆胺。与此同时,我们还发现一些酶也能专门识别阿马多里产物,然后将其降解^[3,4]。

从长远来看,以酶作为抑制剂有诸多优点。首先,酶具有

专一性和高效性,而且几乎不产生副反应。其次,催化反应速度快,与化学试剂相比,所需量是极其微小的。再者,酶可以直接针对阿马多里产物,而如前所述,阿马多里产物是美拉德反应的第一个稳定产物,所以直接清除阿马多里产物将能最有效地干预糖基化级联反应和预防相关疾病^[5]。目前,有两类去糖基化酶已经得到鉴定,它们分别就是果糖氨氧化酶和果糖氨激酶。下面我们就简单介绍一下这两种酶的生化性质以及它们的应用情况。

1 果糖氨氧化酶和果糖氨激酶

果糖氨氧化酶首先被 Horiuchi 等科学家从棒状杆菌属中分离得到。以后又从曲霉中分离并克隆到两种果糖氨氧化酶,分别命名为阿马多里酶 I 和阿马多里酶 II。有意思的是从假单胞菌中分离得到了一种与菌膜结合的果糖氨氧化酶,分子量为 106KDa,但该酶催化断裂的位点去其他菌属中分离得到的果糖氨氧化酶不同,它的催化位点为酮氨键,然而其他酶催化断裂位点则为烷氨键^[6,7]。

果糖氨氧化酶现已在不同微生物中分离克隆得到。相关特性如表 1 所示。

表 1 目前已知的一些果糖氨氧化酶的特性^[5]

Table 1 Properties of currently known fructosyl amine oxidase enzymes^[5]

来源	分子量(KDa)	辅酶	产物
假单胞菌	106	Cu ²⁺	H ₂ O ₂
棒状杆菌	88(二聚体)	FAD	H ₂ O ₂ 葡萄糖醛
曲霉菌	83(二聚体)	FAD	H ₂ O ₂ 葡萄糖醛
镰刀霉	50	FAD	H ₂ O ₂ 葡萄糖醛
曲霉菌	51	FAD	H ₂ O ₂ 葡萄糖醛
曲霉菌	49	FAD	H ₂ O ₂ 葡萄糖醛
曲霉菌	106(二聚体)	FAD	H ₂ O ₂ 葡萄糖醛
青霉菌	49	FAD	H ₂ O ₂ 葡萄糖醛
曲霉鸟巢状酶	48	FAD	H ₂ O ₂ 葡萄糖醛

作者简介:刘慧敏,(1982-),女,硕士研究生

研究方向:衰老生物化学

通讯作者:印大中,(1955-),男,教授

Email: dazhongyin@hotmail.com

(收稿日期:2006-05-10 接受日期:2006-06-30)

用 BLAST 程序分析果糖氨氧化酶与其他一些已知同源蛋白。发现该酶与猪、人肾中的 D-氨基酸氧化酶有明显类似之处^[8,9],与单节肌氨酸氧化酶 C 也显示出了 21% 的序列类似性。对果糖氨氧化酶的序列进行分析,我们发现其中许多酶在与 ADP 结合的 β - α - β 折叠区域有一致的序列(GXGXG),这个区域也是 FAD 和 NAD 酶的共有区域^[10]。除此之外,在阿马多里酶 I 的 C 末端有一个保守的半胱氨酸,通过位点突变分析和 AMLDI-MS 分析,大家都认为这是 FAD 的共价结合位点^[10]。阿马多里酶 I 和 II 的主要区别在于动力学方面。有关动力学常数可参照表 2。阿马多里酶 I 亲和疏水底物,而阿马多里酶 II 亲和带电底物。即使对于同一种酶,其活性也随底物大小和所带电荷而有所改变。例如,来自棒状杆菌的阿马多里酶 II 与阴离子底物有更好的亲和性^[11]。在某些情况下,果糖氨氧化酶的活性可以被 P-氯汞苯甲酸,胍和苯胍所抑

制,这就说明这类酶应该存在巯基和羰基。

果糖氨激酶是最近发现的另一类有去糖基化作用的酶。Delpierre 等人第一次从红细胞溶解产物中分离得到了果糖氨激酶,接着从人和小鼠中分别克隆得到了果糖氨激酶,同源性达到了 80%。Szwergold 等人也从人体红细胞中纯化并克隆到果糖氨氧化酶,与 Delpierre 等人得到的该酶类似。

用 BLAST 程序分析,在不同菌种的基因组中都存在一个开放可读框,用来编码同源蛋白。这些同源蛋白含有约 300 个氨基酸,与人或小鼠的果糖氨激酶有 30% - 40% 的同源性。其中一段含有 HGDLSGN(人体中的果糖氨激酶的 214 到 221 号蛋白质残基)的序列特别保守。

定量 PCR 表明在所有组织中都有果糖氨激酶的表达。但在肾脏中表达水平特别高。

表 2 果糖氨氧化酶的底物特性^[5]

Table 2 Substrate specificity of fructosyl amine oxidases^[5]

来源	Km(底物)	Vmax(s ⁻¹)
假单胞菌	0.14mM(ϵ -果酰氨基己酸盐)	
棒状杆菌	0.74mM(果酰氨基乙酸)	8.78
	0.71mM(果酰苯基丙胺酸)	14.9
曲霉菌	2.2mM(果酰氨基乙酸)	
	5.9mM(果酰 β -丙胺盐)	
	220mM(果酰甲胺)	
镰刀霉	0.22mM(N ⁺ -果酰 N ⁺ -Z-赖氨酸)	101
	1.33mM(Na-果酰 Ne-Z-赖氨酸)	105
曲霉菌(阿马多里酶 I)	3.1mM(N ⁺ -果酰 N ⁺ -t-Boc-赖氨酸)	5.3
	14.7mM(果酰金刚烷胺)	0.9
	9.75mM(果酰氨基乙酸)	0.6
	0.023mM(果酰丙基胺)	5.8
曲霉菌(阿马多里酶 II)	1.6mM(N ⁺ -果酰 N ⁺ -t-Boc-赖氨酸)	5.5
	3.4mM(果酰金刚烷胺)	2.3
	0.23mM(果酰氨基乙酸)	3.2
	2.53mM(果酰丙基胺)	2.7

2 果糖氨氧化酶和果糖氨激酶的作用及其影响因素

果糖氨氧化酶最主要的作用是能够氧化葡萄糖阿马多里产物并且生成 H₂O₂,阿马多里产物被氧化后又会立即通过水解作用分解掉。现发现的果糖氨氧化酶只能去糖基化小分子物质,对大分子物质如小牛血清白蛋白或核糖核酸酶 A 一般无效。原因就是只有底物与酶活性位点足够近的时候这种酶才发挥作用。但酶活性位点不一定都在其表面,所以小分子物质相对就容易进入活性位点。对于与蛋白结合的底物,许多因素都可能影响酶和底物的相互作用。例如,如果蛋白中的阿马多里产物埋藏在相临残基内,那么该酶很可能不能识别它们;相对地,如果酶的活性位点太深了,它就只能识别从蛋白表面突出来的阿马多里产物,但这些突出的产物在蛋白交联中起着重要的作用。除此之外,蛋白表面的电荷也影响着蛋白与酶的相互作用,因此改变糖基化蛋白的表面电荷也可以改变阿马多里酶的活性。

果糖氨氧化酶与性别发展过程也有一定的相关性。我们

已经知道许多真菌中果糖氨氧化酶的表达需要通过在培养基中加入阿马多里产物进行诱导。最近,Jeong 等人的研究表明在曲霉属(*Aspergillus nidulans*)中这样的诱导需要 veA 基因的参与。该基因是性别发展过程中的一个激活基因。单独的 veA 基因也可以诱导果糖氨氧化酶的表达,然而基因本身的表达却不受阿马多里产物的影响。在性别发展期间,由于低氧和低代谢率,葡萄糖可能没有被完全消耗掉,残留的葡萄糖就可形成阿马多里产物。在稍晚的时候,又诱导产生果糖氨氧化酶,阿马多里产物被可能被降解从而产生碳源和氮源。但是如果突变除去果糖氨氧化酶基因,其突变型和野生型并没有任何表型差异。因此,该酶的这个作用仍需要进一步研究。

除此之外,果糖氨氧化酶还可能携带了某些信号。一个有趣的发现是,来自曲霉属(*Aspergillus terreus*)和青霉属(*Penicillium janthinellum*)的果糖氨氧化酶的 C 末端的三肽分别为丝氨酸-赖氨酸-亮氨酸和丙氨酸-赖氨酸-亮氨酸^[12]。它们都属于一种过氧化物酶体信号分子。

但是直到目前为止,果糖氨氧化酶的生理学作用还不是很清楚。这类酶存在于各种生物中,如原核生物,真菌以及酵

母菌中。这让我们很自然地想到去糖基化酶在进化中的重要地位。然而,令人迷惑的是,在稍高级的生物中却找不到具有类似功能的酶了。

果糖氨激酶也是一种重要的去糖基化酶。它很容易将糖基化了的蛋白上的赖氨酸果糖残基磷酸化,将赖氨酸果糖转化为3-磷酸赖氨酸果糖^[13],3-磷酸赖氨酸果糖又分解成游离赖氨酸,无机磷酸和3-脱氧葡萄糖醛酮(3-DG)。因此学者们认为果糖氨激酶是通过形成3-磷酸赖氨酸果糖而移除阿马多里产物的。但现公认的这类酶的去糖基化机制存在一个潜在的问题。那就是3-DG能使酶失活,抑制细胞生长和复制,而且还与糖尿病中的并发症有一定关系。因此,对于一个果糖氨激酶控制的去糖基化系统,必须同时有一个去3-DG毒性的保护系统。在许多组织中已发现一类酶,它们能催化3-DG还原^[14],这类酶很可能就是去毒化的候选酶。

另外,果糖氨激酶与代谢也有联系。最近研究发现在E coli中存在一条利用阿马多里产物的途径^[15],但需要一种激酶和一种去麦芽糖糊精酶的参与。这种激酶属于P_{ab}/核糖激酶家族,在ATP参与下,赖氨酸果糖磷酸化成6-磷酸赖氨酸果糖。去麦芽糖糊精酶则催化6-磷酸赖氨酸果糖转变成赖氨酸和6-磷酸葡萄糖。这两种酶很可能就负责着E coli中的赖氨酸果糖的代谢。

3 总结和展望

非酶糖基化与人的许多疾病和衰老都有紧密的联系。而去糖基化酶可以移除蛋白质上的阿马多里产物,从而消除糖基化所带来的负面影响。因此如果能够找到一种合适的,最有效地干预糖基化级联反应的去糖基化酶,就可以在很大程度上减少机体损伤,预防多种疾病甚至可以延缓衰老。因此我们预计在不久的将来,去糖基化酶可能会在抗衰老药物领域占有一席之地。除此之外,去糖基化酶对于蛋白质的一级结构的分析,糖基与蛋白质、糖类与糖类之间的相互作用的研究提供了便利。因此可以更加方便研究糖基化在生理和病理过程中的作用,并且可以在某些蛋白质的适当部位引入糖基,改变蛋白质的生理功能,从而为新药物的设计提供新的思路。

总之用酶完成去糖基化的优势将越来越明显,但目前我们仍没有一种完美的酶可以在体内细胞外环境中去降解糖基化蛋白。尽管在去糖基化酶的应用方面有各种困难,但是在理论上还是可行的。下一步我们将进一步研究这些酶的特性以及影响酶和底物相互作用的条件,酶晶体结构和蛋白质工程方面的信息,引起酶失活的生物电作用和空间阻隔等问题,期望能够工程化现存的去糖基化酶,以便充分发挥它们的作用。

参考文献

- [1] Pugliese G, Tilton RG, Speedy A, et al. Vascular filtration function in galactose-fed versus diabetic rats: The role of polyol pathway activity[J]. *Metabolism*. 1990,39(7):690-697
- [2] Monnier VM, Sell DR, Wu X, et al. The prospects of health and longevity from the inhibition of the Maillard reaction in vivo[J]. *International Congress Series*. 2002,(1245):9-19
- [3] Bowers GJ, MacVittie TJ, Hirsch EF, et al. Prostanoid production by lipopolysaccharide-stimulated Kupffer cells[J]. *Journal of Surgical Research*. 1985,38(5):501-508
- [4] Khatami M, Suldan Z, David I, et al. Inhibitory effects of pyridoxal phosphate, ascorbate and aminoguanidine on nonenzymatic glycosylation[J]. *Life Science*. 1988,43(21):1725-1731
- [5] Wu X, Vincent M. Enzymatic deglycation of proteins[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2003,419(1):16-24
- [6] Ahitkari UM, Saxena AK, Gurtu S, et al. Biologically active indolyl-methyl-1,3,4-oxadiazoles, 1,3,4-thiadiazoles, 4H-1,3,4-triazoles and 1,2,4-triazines[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 1996,31(7):629-634
- [7] Lapolla A, Gerhardinger C, Chezzo E, et al. Identification of furoyl-containing advanced glycation products in collagen samples from diabetic and healthy rats[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1990,1033(1):13-18
- [8] Fukui K, Ohya-Nishiguchi H, Kamada H. Pulsed EPR study of imidazole-coordinated oxovanadium(IV) complexes relevant to the active-site structure of vanadium bromoperoxidase[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 1997,67(1-4):392
- [9] Ben-Yoseph Y, Momoi T, Baylerian MS. Km defect in neuraminidase of dysmorphic type sialidosis with and without β -galactosidase deficiency[J]. *Clinica Chimica Acta*. 1982,123(3):233-240
- [10] Borchert TV, Abagyan R, Wierenga RK, et al. The crystal structure of an engineered monomeric triosephosphate isomerase, monTIM: the correct modelling of an eight-residue loop[J]. *Structure*. 1993,1(3):205-213
- [11] Wu X, Palfey BA, Mossine VV, et al. Kinetic studies, mechanism and substrate specificity of amadoriase I from *Aspergillus* sp[J]. *International Congress Series*. 2002,(1245):379
- [12] Zhao S, Wu X, Hori T, et al. Deformation and stress localization at the Nankai subduction zone, southwest Japan[J]. *Earth and Planetary Science Letters*. 2003,206(1-2):145-160
- [13] Rolin DB, Pfeffer PE, Osman SF, et al. Structural studies of a phosphocholine substituted β -(1,3); (1,6) macrocyclic galcan from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1992,1116(3):215-225
- [14] Swergold BS, Beisswenger PJ, Howell SK, et al. Nonenzymatic glycation: a novel hypothesis on the etiology of diabetic complications[J]. *International Congress Series*. 2002,(1245):143-152
- [15] Wiame E, Duquenne A, Delpierre G, et al. Identification of enzymes acting on α -glycated amino acids in *Bacillus subtilis*[J]. *FEBS Letters*. 2004,577(3):469-472