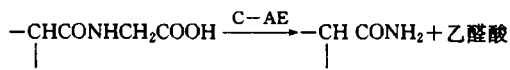


C-末端酰胺化酶的研究进展

王翔林

(沈阳药学院 沈阳 110015)

C-末端酰胺化酶(Carboxyl-terminal α -Amidating Enzyme, c-AE), 又称甘氨酸酰化单氧酶 (Peptidylglycine α -Amidating monooxygenase, PAM, EC 1.14.17.13) 是动物体内普遍存在的一种酶。它在动物体内的生理活性是催化如下反应:^(1,2)



经C-末端酰胺化后而表现出生理活性的蛋白质、肽类,如:降钙素、降钙素基因相关肽(CGRP)、胃泌激素、促胰激素血管作用性小肠肽(VIP)、生长激素释放因子(GRF)、促肾上腺皮质激素释放因子、P物质和杀菌肽等都是生物体内,通过C-AE酶反应,从甘氨酸加成体转化而来的,其C-末端的酰胺结构是生理活性所必须的。而这些具有生理活性的多肽的大多数都是有效的医药品,如:降钙素、促胰激素等作为医药品有市售。一直以来,这些多肽的来源都是从生物体内分离出来,经过提纯精制得到的,工艺比较复杂,而且能够提取这些多肽的生物体原料也比较紧张,所以市售的上述肽类价格很贵。近年来,运用基因重组技术,试产了这类有生理活性的多肽,但是以大肠杆菌、酵母、枯草杆菌等为宿主,运用基因重组表达的方法难以解决多肽的C-末端酰胺化,这是基因重组方法生产上述多肽的障碍。所以人们设想通过基因重组方法生产甘氨酸肽,在生物体外模仿生物体用C-末端酰胺化酶进行酰胺化,这种技术要求简单可行,费用合理^(3~8)。因此近年来,对C-AE的开发研究得以迅速发展。日本通过基因重组表达、用C-AE进行酰

胺化方法生产的降钙素已经进入临床试验。C-AE的开发研究对生产多肽类医药品有着非常重要的意义。

1. 来源与结构

C-AE广泛存在于动物的各种组织中,它调节众多的肽底物的活性,而在生命过程中起着重要作用。在体内主要以膜结合和可溶两种形式存在,各组织中的活性以心房肌细胞和垂体中的活力为高,在大鼠各组织中的活力分布和总活力见表1和表2⁽⁹⁾,在羊脑中的分布见图1⁽¹⁰⁾,大鼠垂体前叶和垂体细胞系中膜结合形式占40~60%,而神经介质中仅占10%⁽¹¹⁾。为了弄清生物体内的酰化机理,进而通过基因重组生产甘氨酸多肽,在生物体外对C-末端进行酰胺化,从而得到生物活性多肽,人们对C-AE进行了提纯试验,至今,所提纯精制的酶比活性,比该原料中酶活高100倍以上。有报道可以从下述组织器官中提纯,如:牛脑垂体⁽¹²⁾、猪脑垂体^(13,14,59)、猪心房^(15,60)、美国爪蛙体皮⁽¹⁶⁾、大鼠心房⁽¹⁷⁾、大鼠甲状腺⁽¹⁸⁾、大鼠甲状腺肿瘤⁽¹⁹⁾和马血清⁽²⁰⁾等。另一来源是通过基因重组表达获得C-AE,有报道通过下列细胞表达,如:小鼠C127细胞⁽²¹⁾、牛主动脉内皮细胞⁽²²⁾、小鼠肾上腺肿瘤AtT-20/D16V细胞^(23,24)、小鼠垂体AtT-20细胞⁽²⁵⁾、大鼠胰腺⁽²⁶⁾、大鼠甲状腺肿瘤CA-77细胞⁽²⁷⁾、COS细胞⁽²⁸⁾和CHO细胞等。C-AE的结构很复杂,不同种属来源的C-AE结构亦不相同,见图2⁽²⁹⁾。在大鼠心房中至少有两个主要的mRNAs编码的C-AE:rPAM-1和rPAM-2,

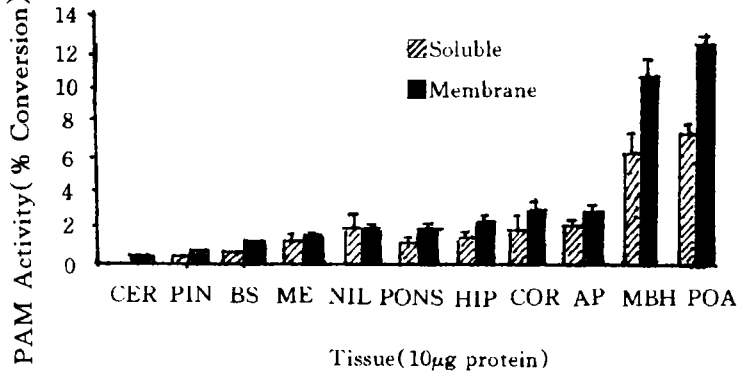


图 1. 羊脑中 PAM 的活力分布。

- 图表示未标记底物背景下 $10\mu\text{g}$ 蛋白转化放射性标记底物的百分数。
- 每个数据为 4 只不同羊样品测定值的均值。
- CER: 小脑, PIN: 松果体, BS: 脑干, ME: 正中隆起, NIL: 垂体神经中叶 PONS: 脑桥髓质, HIP: 海马, COR: 大脑皮质 AP: 垂体前叶 MBH: 下丘脑内侧基底, POA: 视叶前下丘脑。

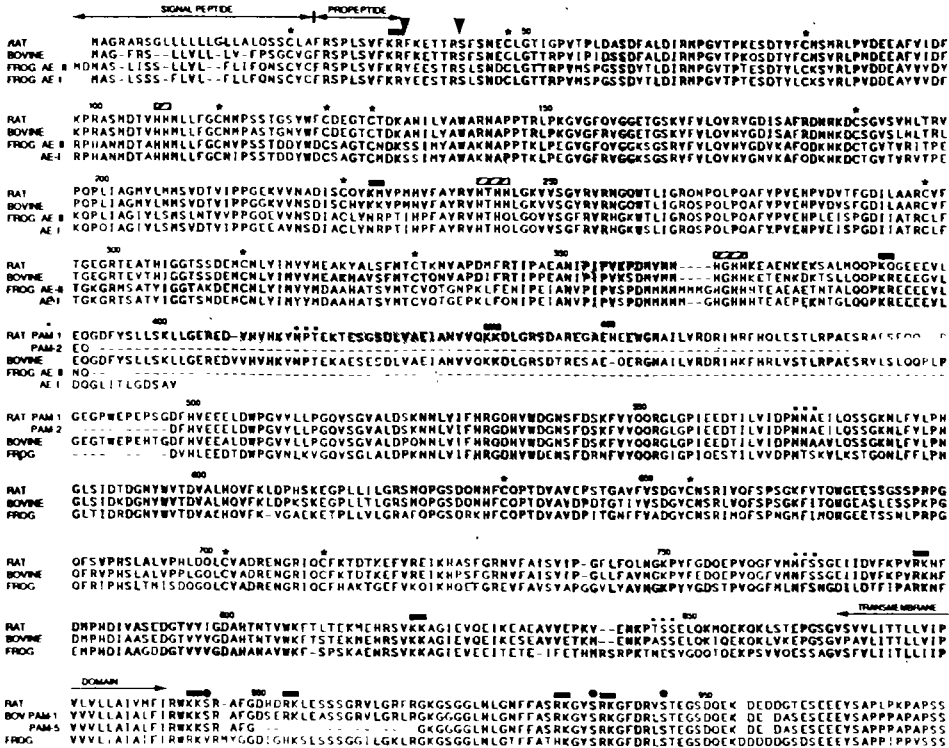


图 2 Rat(大鼠)、Bovine(牛)和 Frog(蛙)的氨基酸序列比较

* 代表半胱氨酸 • 为潜在的磷酸化位点 ▨ 为一组组氨酸残基 ■ 为碱性氨基酸对
 ■■■ 为潜在 N 糖基化位点, 其中氨基酸顺序编码为 rPAM-1 的

牛垂体中有 λ PAM-1 和 λ PAM-5 以及蛙皮中 α -AE-1 和 α -AE-2 等,但都具有相似的酶功能。

表 1. 在大鼠各种组织中 C-AE 的活性分布

组 织	活 力(均值 \pm SD) [pmol/(mg protein · h)]
垂体前叶	320 \pm 120
垂体神经中叶	340 \pm 160
下丘脑	140 \pm 50
脑剩余	32 \pm 18
小 脑	11 \pm 8
下颌下腺	88 \pm 30
腮 腺	7 \pm 10
甲状腺	10 \pm 6
肾上腺	1.1 \pm 0.7
胰 腺	0.2 \pm 0.2
辜 丸	0 \pm 0.1
卵 巢	1.5 \pm 0.4
十二指肠	0.3 \pm 0.5
胃 窦	2.0 \pm 0.6
胸 腺	1.1 \pm 0.6
脾	0.6 \pm 0.6
肾	0.9 \pm 0.7
肝	0.2 \pm 0.3
脂肪组织	0.5 \pm 0.4
肺	0.9 \pm 0.6
骨骼肌	0.3 \pm 0.4
心 肌	3.2 \pm 2.9
血 清	84 \pm 20[pmol/(ml · h)]

表 2. 在大鼠各组织中 C-AE 的总活力

组织	pmol/(h. tissue)			
	1	2	3	4
血清 pH7	1100	900	770	1260
下丘脑	294	135	100	123
小 脑	60	15		
脑剩余	2100	790		
垂体前叶	340	180	260	380
垂体神经中叶	68	29	13	28
下颌下腺	4200	2900	1800	2360

注:1. 为 3 只 270g 大鼠均值,2. 为 2 只 280g 大鼠均值。

3. 为 7 只 290g 大鼠均值,4. 为 10 只 290g 大鼠均值。

2. 作用机制

C-AE 能够特异地作用于 c-末端的甘氨酸肽键,而对前面的氨基酸没有特异性。C-AE 的作用机理通过 14 C 同位素标记证明包括脱氢和水解作用^[1],通过立体特性标记[2- 3 H]甘氨酸和酶反应形成 14 C-乙醛酸推断,其可能

的氧化机制如图 3^[30,31]。用 18 O 同位素标记和 13 C NMR 的位移证明 C-AE 为单氧化酶^[32],又用快速原子轰击质谱(FABMS)确定了 18 O 进入羟甘氨酸^[33,34],进一步说明了 C-AE 的直接产物不是酰胺化肽,而是 α -羟甘氨酸。也就是说酰胺化反应是由双功能 C-AE(PAM)前体所编码的两个酶区相继作用的结果,即先是经甘氨酸羟化单氧化酶[Peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase, PHM, EC. (1. 14. 17. -)]

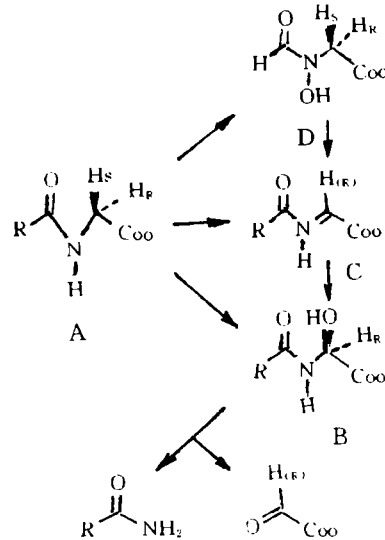


图 3 c-AE 可能的氧化机制

羟基化反应,然后经羟甘氨酸酰化水解酶[Peptidyl- α -hydroxyglycine N-C lyase, PHL, EC(4. 3. 2. 5)]水解反应,去掉乙醛酸形成酰胺^[13,14,22]。见图 4。

C-AE 有两个最适 PH 为 6.5~7.0 和 8.0~9.5^[35];酶反应需要分子氧,一般在酶反应中加入适量过氧化氢酶;Cu²⁺和 Vc 是该酶的辅助因子,适宜浓度的 Cu²⁺可使酶活增加 7 倍,而 Vc 的加入可使酶的表现 Km 和 Vmax 分别增加 30 和 60 倍^[36,37]。其中 PHM 是 Cu²⁺、Vc 和分子氧依赖酶,PHL 的最适 pH 值为 5.0,高浓度盐可以抑制 PHL 活性,且可被硫醇试剂和脲素所阻碍,EDTA 抑制可用 Cd²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、Ca²⁺等二价离子还原^[38]。

3. 测定方法

C-AE 活性测定的有关报道是采用离子交换色谱、薄层色谱、高效液相色谱和有机溶剂提取等方法,将底物 c-末端甘氨酸肽与产物之一的酰胺化物或乙醛酸分离,然后分别定量计算其活性值方法。其中使用放射性标记底物的方法有:Eipper 等^[2]用¹²⁵I-D-Tyr-Val-Gly 为底物,阳离子交换色谱分离底物和酰胺化物的方法;Gomez 等^[39]和 Kizer 等^[40]用³H-pGlu-His-Pro-Gly 为底物进行酶反应,薄层色谱及反相高效液相色谱法分离底物与酰化产物的方法;Mollay 等^[41]用¹⁴C-succinyl-Ala-Phe-Gly 为底物,滤纸电泳分离酰胺化产物的方法;Mizuno 等^[16]用¹²⁵I-Ac-Tyr-Phe-Gly 为底物,乙酸乙酯提取酰胺化物的方法;官

崎等^[42]用 I-D-Tyr·Gly 为底物,薄层色谱分离酰胺化产物的方法进行测定。使用基团修饰的 C-末端甘氨酸肽为底物进行测定的方法有:Engels 等^[43]用 DIS-D-Ala·Pro·Gly 为底物,生成的酰胺化物用二氯甲烷提取,HPTLC 薄层板展开后检测的方法。Jones 等^[44]和 Chikuma, Toshiyuki 等^[15]用 N-DNS-Tyr·Val·Gly 和 DNS-Gly·Phe·Gly 为底物进行反应,高效液相色谱分离酰胺化产物的方法;Katopodis 等^[45]用 TNP-D-Tyr·Val·Gly 为底物,HPLC 分离测定酰化产物的方法,此外 Moray 等^[46]以 D-Tyr·Val·Gly 为底物,使用抗体放射性检测生成的酰胺化物的方法进行定量测定。另一方面不检测生成的酰胺化物,而是测定另一个生成物乙醛酸进行定量的方法,如:Ramer 等^[31]以 D-Tyr·Val-1.2

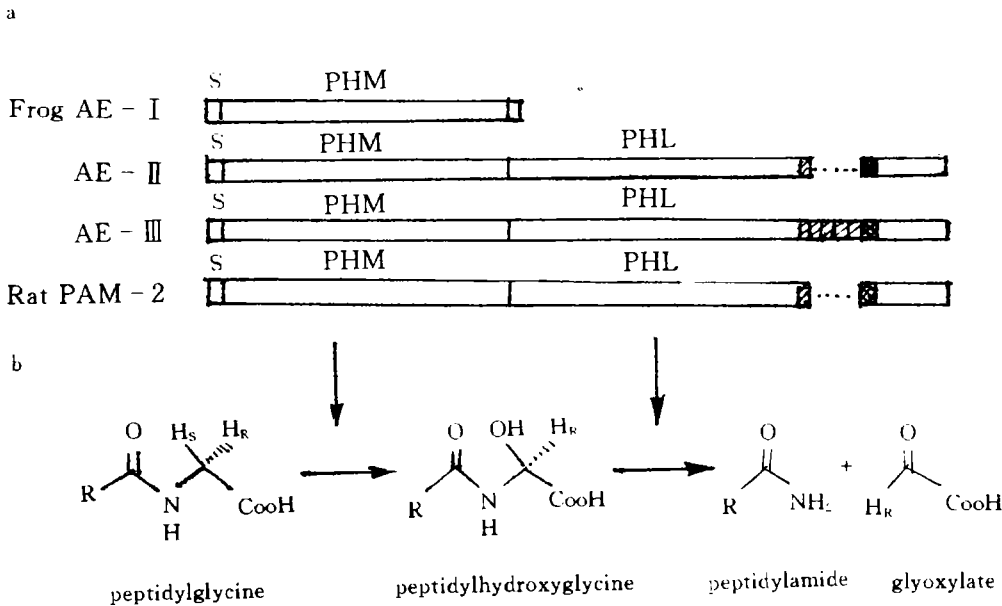


图4 c-AE 前体结构(a)和两个酶区与两步酰代反应的关系(b)

^{14}C -Gly 为底物进行反应,乙醛提取生成的 $1,2-^{14}\text{C}$ -乙醛酸并对此定量测定的方法;饭田等^[47]以 C-末端甘氨酸肽为底物进行酶反应,然后加入 NADH 在乙醛酸还原酶的作用下,检测 340nm 吸光度定量乙醛酸的方法;Baker 等^[48]用盐酸苯肼与乙醛酸反应生成乙醛酸苯和肼,然后用分光光度计进行测定的方法;Kieber 等^[49]用反相 HPLC 分离测定乙醛酸的方法;Robins 等^[50]用氰氢硼化钠还原生成的乙醛酸再用酸分析仪测定的方法;Tuchman 等^[51]用毛细管气相色谱分离乙醛酸,质量分析仪检测的方法;Koike 等^[52]用 HPLC 分离后荧光光度计测定乙醛酸的方法。由以上方法可以看出,分离产物之一进行定量的方法比较麻烦、费时、影响结果的准确性,因此建立不经分离而直接定量产物之一计算活力的方法是十分必要的。

4. 制备方法

C-AE 的制备方法有生化提取法和基因重组表达法。采用生化提取制备的有:Kizer 等^[53]以猪垂体为原料,在 0.05MPBS (0.2MNaCl, PH6.2) 中反复冻融、匀浆、离心,用 sephadex G-100 分离, D-Tyr·Val·Gly 底物亲和层析纯化, SDS-PAGE 测定分子量为 64,000, 纯酶在冷冻和融化状态下失活很快, 半衰期约二周, 而在 0°C, PH7.0~7.2 较稳定。Murthy. 等^[54]用牛垂体为原料, 在 20mMNa TES (PH8.5) 中 4°C 下匀浆, 离心, 上清用 25~45% (NH₄)₂SO₄ 沉淀, 重新溶于 20mMNa TES (PH8.5) 中用 25~75% 乙醇沉淀, 然后用金属离子 (Cu²⁺) 螯合亲和层析和底物亲和层析纯化, 最后用凝胶过滤得到 PAM-A 和 PAM-B. Dickinson 等^[55]以猪垂体和心房为原料, 在 50mM Tris·HCl (PH7.0) 中匀浆、-70°C 冻融三次、离心, 上清液进行 Sephadex G-100 柱层析, 再用 MonoQ 阳离子和 Mono S 阴离子交换柱的 FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography), 0-1.0MNaCl 梯度洗脱进行纯化得到 PAM-A, PAM-B. Iida Toshii 等^[20]以马血清或血浆等动物血为原料, 经 30~50% (NH₄)₂SO₄ 或 10~15% PEG-6000 沉淀, Phe

·Gly·Phe·Gly 底物亲和层析和透析、凝胶过滤等手段制备了 C-AE。Mehta 等^[18]从大鼠甲状腺肿瘤中, 用 150mM TrisHCl (PH7.5) 匀浆抽提, 离心, 上清用 26~40% (NH₄)₂SO₄ 沉淀, 经 Sephacryls-300 凝胶过滤, 用强阳离子树脂 Mono Q HR 柱, 0-300mM NaCl 梯度洗脱进行分离得四个活性峰。采用基因重组表达制备的有: Natori, Shunji^[56]从牛脑垂体 mRNA 衍生的 λ gt11 cDNA 文库中分离了 PAM cDNA, 并克隆了 λ PAM-1 基因, 转化 E. coli. 表达 β -galactosidase-PAM 融合蛋白。Perkins 等^[57]克隆了编码牛 PAM 前体 108KDa cDNA, 表达载体在小鼠金属硫因-1 操纵子控制下, 在转移小鼠垂体前叶促肾上腺细胞中表达, PAM mRNA 和 PAM 活性分别比原细胞高 15 和 7.5 倍。Iida 等^[58]从马心房构建了 λ gt10 cDNA 文库, 用 2 个从大鼠 C-AE cDNA 获得的 DNA 探针筛选 cDNA, 并转移到 CHO 细胞表达了大鼠 C-AE。日本三得利公司建立了蛋白 C-末端酰胺化工厂, 生产降钙素、副甲状腺激素 (PTH) 等激素和胰泌素等许多脑消化管肽及多种蛋白性的生理活性肽。酰胺化酶 (C-AE) 具有 7 对 S-S 键, 不能在大肠杆菌中表达活性型的酶, 所以该公司用转移蛙来源的 α -AE 基因的中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 为宿主, 用无血清培养基的悬浮培养法大量生产活性型 α -AE。

总之, 蛋白的酰胺化是重组蛋白医药开发的重大课题之一, C-AE 的开发研究对重组蛋白医药品的工业化生产具有十分重要的意义。

参考文献

1. Bradbury, AF, et al; Nature, 1982, 299, 686
2. Eipper B, A, et al; Proc, Natl, Acad, Sci, U, S, A, 1983, 80, 5144.
3. Okamoto, Hiroshi; EP, C12P21/00, 305, 063, 1989
4. Matsuo, Hisayuki, et al; EP, C12N9/02, 333, 399, 1989
5. Gilligan, James P. et al; EP, C12N9/00, 308, 067, 1989
6. Omori, Muneki, et al; JP, C12P21/00, 62, 205, 795, 1987
7. Makabe, Osamu, et al; JP, C12N9/02, 0304, 784, 1991
8. De Castiglione, Roberto, et al; De, C07K7/06, 3, 923, 583, 1990
9. B, A, Eipper, et al; Endocrinology, 1985, 116(6): 2497~504

10. Lew, Rebecca A, et al; *Endocrinology*, 1992, 130(2); 994~1000
11. Victor May, et al; *J. Biol. Chem.*, 1988, 263(16); 7550~4
12. Braas, Karen M, et al; *Endocrinology*, 1992, 130(5); 2778~88
13. Yasuno Iwasaki, at al; *Eur. J. Biochem.*, 1991, 201(3); 551~9
14. Shimoi, Hiroko, et al; *Eur. J. Biochem.*, 1992, 209(1)189~94
15. Chikuma, Toshiyuki, et al; *Anat. biochem.*, 1991, 198(2); 263~7
16. Mizuno, et al; *Biochem, Biophys, Res, Commun.*, 1986, 137; 984
17. Perkins, S. N, et al; *Endocrinology*, 1990, 127(6); 2771~8
18. Mehto, N. M, et al; *Arch, Biochem, Biophys*, 1988, 261(1); 44~54
19. James P. Gilligan, et al; *Endocrinology*, 1989, 124(6); 2729~36
20. Iida Toshii, et al; *Wo, C12N9/02*, 12, 096, 1989
21. Merkler David J, et al; *Arch, Biochem, Biophys*, 1992, 294(2); 594~602
22. Oldham, Charlie D, et al; *Biochem, Biophys, Res, Commun.*, 1992, 184(1); 323~9
23. E. A. Thiele, et al; *Endocrinology*, 1989, 125(5)2279~88
24. E. A. Thiele, et al; *Endocrinology*, 1990, 126(2); 809~17
25. Milgram, Sharon L, et al; *J. Cell, Biol.*, 1992, 117(4); 717~28
26. J, Y, Maltese, et al; *Biochem, Biophys, Res, Commun.*, 1989, 158(1)244~50
27. G. A. Beaudry and A, H, Bertelsen; *Biochem, Biophys, Res, Commun.*, 1989, 163(2); 959~66
28. J, Glauder, et al; *Biochem, Biophys, Res, Commun.*, 1990, 169(2); 551~8
29. Doris A, Stoffers, et al; *Proc, Natl, Acad, Sci, U. S. A.*, 1989, 86(2); 735~9
30. Shawn E. Ramer, et al; *Pure Appl. Chem.*, 1989, 61(3); 489~92
31. Shawn, E, Ramer, et al; *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110(25); 8526~32
32. Merkler, David J, et al; *Biochemistry*, 1992, 31(32); 7282~8
33. Zabriskie, T, Mark, et al; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1991, 8; 571~2
34. Noguchi, Masato, et al; *Biochem, J.*, 1992, 283(3); 883~8
35. Masato Noguchi, et al; *Arch, Biochem, Biophys*, 1989, 275(2); 505~13
36. Christopher C. Glembotski; *J. Biol. Chem.*, 1984, 259; 13041
37. C. C. Glembotski, et al; *J. Biol. Chem.*, 1984, 259; 6385
38. Betty A. Eipper, et al; *J. Biol. Chem.*, 1991, 266(12); 7827~33
39. Gomez, S, et al; *FEBS Lett.*, 1984, 167; 160~4
40. Kiger, et al; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1984, 81; 3228
41. Mollay, C. et al; *FEBS, Lett.*, 1986, 202; 251~4
42. 宫崎等, *生化学*, 1989, 61; 931
43. Engels, et al; *Protein Engineering*, 1987, 1; 195
44. Jones, B. N, et al; *Anal, Biochem.*, 1988, 168; 272~9
45. Katopodis, A, G, et al; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, 151; 499~505
46. Moray, et al; *J. Neurosci, Methodes*, 1985, 14; 293
47. 饭田等; *JP. C12Q1/26*, 99, 498, 1992
48. Baker, et al; *Methods Enzymology*, 1966, 9; 339
49. Kieber, et al; *J. Chromatogr.*, 1983, 283; 135
50. Robins, S. P. et al; *Anal, Biochem.*, 1984, 142; 24~27
51. Tuchman, et al; *J. Chromatogr, Sci.*, 1984, 22; 198
52. Koike K, et al; *Anal, Biochem.*, 1984, 141; 481~7
53. J. S. Kizer, et al; *Endocrinoloy* 1986, 118(6); 2262
54. A. S. N. Murthy, et al; *J. Biol. Chem.*, 1986, 261(4); 1815
55. C. J. Dickinson, et al; *J. Biot. Chem.*, 1991, 266(1); 334
56. Natori, Shunji; *Wo, C12N9/00*, 02, 460, 1989
57. Perkins, S. N. et al; *Mol, Endocrinol*, 1990, 4(1); 132
58. Iida Toshii, et al; *Wo, C12N9/02*, 02, 790, 1991
59. Bradbury, et al; *Eur. J. Biochem.*, 1987, 169; 579
60. Kojima, et al; *J. Biochem.*, 1989, 105; 440