

酶的定向进化

蒋本国 范圣第 刘宝全

(大连民族学院生物工程系 大连 116600)

摘 要 酶的定向进化是发展迅速的重要生物工程技术之一,是改进酶的热稳定性、耐酸碱性、耐有机溶剂性、底物特异性、立体选择性等性质,使酶更适于工业应用的重要途径。定向进化也是研究抗体酶的主要途径。本文综述了酶的定向进化的意义、策略与主要技术手段以及对成功的酶定向进化的基本要求,并综述了在最近几年内,酶的定向进化研究所取得的主要进展。

关键词 酶 定向进化 性质 改进

Some Progresses of the Directed Enzyme Evolution

Jiang Benguo, Fan Shengdi, Liu Baoquan

(Dalian Nationalities University, Dalian 116600)

Abstract The directed enzyme evolution is one of the important bioengineering technologies that was developed rapidly, it is also the necessary way through which the traits of enzymes, such as thermostabilities, pH tolerance, activities in organic solvents, substrate specificities and enantioselectivities, are improved and to make enzymes more suitable to industrial uses, it is also the main way for enzyme researches. In this paper the significance, the strategy and the main technology ways, the basic demand of the directed enzyme evolution were reviewed, and the main progresses in the directed enzyme evolution achieved in recent years were also reviewed.

Key words Enzyme, Directed evolution, Trait, Improve

酶作为生物催化剂其专一性和高效性是一般催化剂所不能比拟的。将酶催化用于工业生产必然会引发一场新的变革^[1]。但是天然酶的许多性质不适应工业生产的条件^[2],酶的定向进化是为满足这种需求而改变酶的结构和性质的有效途径。

天然蛋白质分子的进化依赖于自然选择和变异法则。近年发展起来的酶定向进化技术使人们可能开发出天然酶蛋白分子不具备的,在自然条件下也不要求其具有的功能^[3]。选择特殊环境,如火山、极地、深海中的高热温泉、碱湖及盐湖来源的酶,利用酶定向进化技术重新设计及改进酶分子的结构和性质,可以逐步接近和满足将酶催化用于工业生产的需要^[4]。本文主要介绍在实验室里为酶的成功定向进化使用的方法和策略,以及在最近几年内酶的定向进化所取得的重要研究进展。

1 酶定向进化的策略与途径

蒋本国 男, 50 岁, 副教授, 现从事生物化学与有机化学的教学与研究工作。

2003-03-04 收稿, 2003-11-04 接受

1.1 对酶实行定向进化的重要意义

天然的生物催化剂存在着无法适应工业化生产中非自然条件的限制。天然酶用于工业生产时,经常不能很好地适应环境的转变。较差的溶解性、不稳定性以及苛刻的酶促反应条件,使其不适于大规模应用^[5]。酶在活细胞的复杂条件下,底物或产物之一可能会强烈抑制酶生物催化过程的活力。相反,生物技术需要酶是稳定的(这一点与细胞内蛋白质需要快速更新^[6]不协调),在非水溶液中是活性的(这一点可能在绝大多数生物环境中是不需要的)以及酶能够接受不同的底物(在自然界中不存在的底物)。这就需要酶进行定向进化,克服这些不足。

1.2 酶的定向进化策略

在实验室中重新设计酶同样可以用进化这个手段。但与自然进化相比,需要将进化的时间规模缩减到数月,甚至是数周^[7]。自然界中运行的进化机制保证了对不断变化着的环境的适应性,进化既不朝任何特定的方向运行,也不存在一个目标。相反,酶分子定向进化实验有特定的目标,要求通过简捷的途径,即通过随机变异、重组等手段,使蛋白质获得不同的能力,得到比较理想的酶功能^[8]。

1.3 酶定向进化的主要途径

定向进化的遗传差异性产生于变异和/或重组。将改变的基因克隆进入质粒,在合适的宿主生物(细菌或酵母)中表达。改进酶的克隆表达在高通量筛选中鉴别与挑选,然后将编码这些改进酶的基因分离出并在下一轮定向进化中循环。定点突变自 1980 年起用于产生具有增进性质的酶^[9],并利用蛋白质工程和计算机模拟技术,预测和嵌入特殊的氨基酸调整酶的三维结构,改进最适 pH、最适温度、稳定性、底物专一性。使用具有预先设计的寡核苷酸引物的相应 DNA,导致具有理想特性的酶的表达。几种目前比较常用的酶人工进化技术在过去几十年中发展起来^[10],大大强化了基因调控的能力。酶分子改良的一项实用技术是通过向相应 DNA 分子随机引入碱基,再经筛选获得所需的突变株。这一技术所依靠的是易错 PCR,改变反应体系中的 Mg^{2+} 和 dNTPs 浓度便可有效的控制所引入的点突变率。通过易错 PCR 可以获得酶分子的随机突变体。然后多重这样的小步幅取代变异(每次 1~2 个氨基酸)以相继式或组合式累积起来,获得理想的酶功能^[11]。易错 PCR 在应用上存在一定的限制,一是相当慢,二是仅引入点突变,三是涉及的基因片段太短(少于 800 碱基对),称作无性 PCR^[10]。

另一种途径是在基因的相对小的区域中定向高水平的随机变异^[12]。在完整基因上的变异可以发现意想不到的结果,定向的变异可能产生新的氨基酸取代物组合,这种组合是小步幅取代达不到的,因为小步幅取代中某些中间产物可能并不是有利的。

定向进化产生差异性的另一途径是体内同源基因的随机拼接,或家族重排^[13]。两个或多个父辈基因的重组用于产生预期性质的、进化的奇异基因组。重组序列通过渐进进化与具有类似结构和功能的共同祖先相联系,在序列空间上表现出很大的跨越,能够产生功能改良蛋白质^[14]。DNA 随机重组,允许不同父代序列材料的混合,称作有性 PCR^[10]。体内重组也能产生新的令人感兴趣的奇异酶^[15],但是与体外方法得到的结果相比,其差异性受到限制。

其它几种方法如:外显子 DNA 随机重组^[16]、随机前体重组(RPR)^[17]、增长剪截 (ITCHY)^[18]、随机插入与删除(RID)^[19]、序列同源独立蛋白质重组(SHIPREC)^[20]、增长剪截(ITCHY)和 DNA

随机重组相结合(SCRATCHY)^[21]以及交错延伸(StEP)^[22]等,是相继发展起来的较新的酶定向进化技术手段。

1.4 成功的酶定向进化的基本要求

对成功的定向进化有四个要求:(1)期望的功能必须在物理上是可能的;(2)这个功能也必须是生物的、进化的、可行的;(3)必须能够使变异库足够复杂,使其含有稀有的有用变异^[23];(4)必须可以针对预期的功能进行快速的筛选^[24]。

在酶的性质中,特异选择性特征往往难以改进,但可以比较容易地除去(如产物抑制)。非选择性特征易于改进,但可能难于除去^[25]。改进生物功能从不要求的特征,诸如在非自然环境中的稳定性或活性,或者是对新底物的活性,常常只需小的序列变化,就可以得到较大的改进空间,功能改进也可以累积^[26]。

2 酶定向进化研究进展

酶的定向进化研究主要集中于改进酶的底物特异性、提高催化反应活性、提高热稳定性、提高对有机溶剂的耐受能力以及旋光异构专一性等重要特性方面,并用于抗体酶的研究。在这些方面的努力已经取得明显的进展。本文择要列举最新的研究结果如下。

2.1 改进酶的底物特异性

Kichise 等^[27]采用体外进化实验,首次获得了高活性的、细菌合成生物降解性聚酯——聚羟基烷酸酯(PHA)的关键酶。选择豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae* FA440)的合成酶(PhaC(Ac))为目标酶进行进化。方法是集中在 PhaC(Ac)基因的一个小的区域中,由易错 PCR 介导随机突变,然后用聚酯累积方式筛选具有更高活性的酶。

Witkowski 等^[28]对脂肪酸生物合成中的**b**-酮酯酰合成酶采用随机突变获得的突变体中,以谷氨酸取代活性位点上的亲核性半胱氨酸(Cys-161),完全抑制了缩合反应,但却促进了丙二酰脱羧反应进行,使反应速度提高两个数量级以上。与此对应,用丝氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、甘氨酸和苏氨酸取代半胱氨酸(Cys-161)对缩合反应不利,对丙二酰脱羧反应也没有明显的影响。

Zaccolo 等^[29]对抗生素抗性基因的定向进化,强化卡那霉素磷酸转移酶的热稳定性,并改变了**b**-内酰胺酶的底物专一性。

为获得分子多样性,在可以获得两个或多个适当的同类基因的情况下,家族 DNA 重排已经扩展为非常有力的方法。如疱疹单纯病毒 1 和 2 的胸腺嘧啶激酶基因的四轮重排后,进行筛选,改变了底物的专一性,产生了两个高活性的突变体^[30]。家族 DNA 重排优于单一基因重排,为筛选和选择提供了更多样的序列空间,家族 DNA 重排已经被广泛接受。

Wada 等^[31]使用易错 PCR 进化改变 Neu5Ac 醛缩酶的催化功能,可以用于 D-和 L-糖,一种进化的醛缩酶表现出催化丙酮酸与 N-乙酰-L-甘露糖胺缩合形成 L-唾液酸,并保留了其天然的合成 D-唾液酸的活力。

2.2 酶催化反应活性的改变

Wong 等^[32]用定向进化使 KDPG(D-2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸酯)醛缩酶的活性对非磷酸化甘油醛增加,获得一定成功。野生型的酶显示了 50000/1(磷酸甘油醛/甘油醛)的醛缩反应活性比率,用一个缬氨酸取代一个活性位点上的谷氨酸,取得了催化磷酸甘油醛反应活性下降 20 倍、

对甘油醛活性上升两倍的结果。

b-内酰胺酶是一种水解头孢类抗生素的微生物酶, Stemmer 等^[13]运用 DNA 体外随机拼接技术对**b**-内酰胺酶进行改造, 每次循环后, 从中筛选出数百个酶活提高的突变体 DNA 序列用于下次循环。经过 3 次循环获得一个赋予宿主细胞对头孢菌素抗性提高 16000 倍的突变体。

使用 *E.coli* 表达体系, Arnold 等^[33]将节杆菌(*Arthrobacter sp*) DSM9771 的乙内酰胺酶由 *D*-选择性转变为 *L*-选择性, 并使催化活性增加。他们发现一个保守型的缬氨酸对丙氨酸的突变构成了活性增长的绝大部分, 虽然对反应的机理不是很清楚, 但使用定向进化的方法得到了好几个活性增加 5 倍以上的突变体。

2.3 提高酶热稳定性的定向进化

E.coli 的匀霉素 B(hygromycin B)磷酸转移酶的突变基因文本(HPHmut)可在 75 °C 下用定向进化方法分离出。硫磺矿硫化叶菌(*Sulfolobus solfataricus*)的耐热菌株 HPHmut 转化株表现出较高的热耐受力, 在 65 °C 保温 30min 后, 仍然具有可测量的明显的残留活性。在 *S. solfataricus* MT4 菌株体内试验中, 到 82 °C 这个酶仍具有活性。可能是在细胞内有协调一致的溶质作用、分子伴侣以及其它抗热因素存在, 使这个酶能保证在体内避免热变性并发挥作用^[34]。

通过由家族 DNA 重排得到的 2048b-糖苷酶杂交文库的组建, 对激烈火球菌(*Pyrococcus furiosus*) Ce1B 和硫磺矿硫化叶菌(*Sulfolobus solfataricus*) LacS 两个高温稳定的糖苷水解酶族的结构相容性进行了研究, 检验了杂交体的热稳定性, 水解乳糖的能力和对葡萄糖抑制的敏感性。在 70 °C 进行了三个循环的筛选, 分离出三个突出的杂交酶(杂交体 11、18 和 20), 与初始的 Ce1B 和 LacS 相比, 其水解乳糖的能力分别提高 1.5~3.5 倍和 3.5~8.6 倍^[35]。

Komeda 等^[36]利用随机突变(易错 PCR)后筛选, 重复两次进化 *D*-氨基酸酰胺酶, 获得了热稳定性的变异酶 BFB40, 最适温度提高了 5°C, K_m 值不变, V_{max} 值增强约 3 倍。

2.4 对不同溶剂中的溶解性的改进

在有机溶剂存在下, 酶的稳定性及催化活性常常剧减。Song 等^[37]尝试使用定向进化方法研究在有机溶剂存在下, 提高磷脂酶 A 的稳定性和催化活性。使用易错 PCR 和 DNA 重排后筛选的方法, 分离出三个具有明显稳定性及催化活性的突变体(SA8, SA17 和 SA20)(例如在含 30% DMSO, 1% 卵磷脂凝胶中实验)。第二轮突变库筛选之后, 与野生的酶比较, 所获得的突变体显示出在所有有机溶剂中的稳定性明显增加。

Moore 等^[38]使用随机突变和筛选从枯草芽孢杆菌蛋白酶 E 获得了一个突变株, 能够在 60% DMF 水溶液中使酶活性提高 1000 倍以上。

Yang 等^[39]主要使用 3 个循环的易错 PCR 及 DNA 随机重组以及点定向突变, 使结核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的还原酶 Rv2002 产生了惊人的酶分子溶解性的改进, 大多数可溶性的突变体带有 3~5 个突变, 所有的突变位于保守区域之外, 并远离底物结合部位, 因此这些突变体保留了原有功能。此工作使用了一个新的定向进化策略, 其中编码蛋白质的基因进行随机重组, 将溶解性的突变体挑选出来, 将目标蛋白接到 GFP(绿色荧光蛋白)的 N 末端, 只有当上游目标变异蛋白正常折叠, GFP 才能正常折叠并放出绿光。

2.5 对映立体选择性的提高

旋光异构选择性是酶的一个最重要的也是难于处理的性质。May 等^[33]改进了 *E.coli* 中 *L*-Met 的生产过程。通过随机突变、饱和突变和筛选, *D*-乙内酰脲酶的旋光异构选择性发生了反转(从 $ee_D=40\%$ 变为 $ee_L=20\%$), 催化活性提高了 5 倍。值得注意的是旋光异构选择性的反转, 只有一个单一氨基酸取代就足够了。包含一个单一氨基酸取代的高 *D*-选择性突变体($ee_D=90\%$)也已得到。

Reetz 等^[40]使用定向进化改进绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的脂酶, 提高拆分能力, 从旋光选择性系数 1.1 提高到 11.3, 仅仅经过四代突变就取得了如此巨大的提高。第五代易错 PCR 产物, 经过与热点区域密集突变耦合, 产生了旋光异构选择性系数达到 25.8 的酶, 对应 91% ee 和 18% 的转化率。

Gavin 等^[41]利用定向进化改变 1,6-二磷酸万寿菊糖醛缩酶的立体化学过程, 经过三轮 DNA 随机重组和筛选, 醛缩酶显示了 80 倍的改进(k_{cat}/K_m), 对非天然底物 1,6-二磷酸果糖, 在立体专一性方面也有 100 倍的改进。

2.6 抗体酶的定向进化研究

抗体催化剂^[42,43](abzymes)一般用过渡态类似物免疫方法产生, 第一个体外进化的抗体催化剂, 由 Fujii 等^[44]使用经典的免疫方法完成。他们进行了关键残基的限制性随机突变^[45~47], 大多数注意力集中在活性、专一性和酶在某工艺过程的稳定性方面。近来的工作利用 DNA 杂交热力学与重组过程中的退火, 对这一模型的更进一步改进取得了重要的进展^[48]。

Sandro 等^[49]依靠合成的化学信息库, 进行体外定向蛋白质进化, 利用人结合抗体数据库: HuCAL-scFv 的抗体编码基因, 选择高效率的抗体催化剂。HuCAL-scFv 被筛选, 并进行定向选择, 寻找抗体催化剂, 得到的结果显示出芳基磷酸酯酶活性, 再经易错 PCR 等进一步选择循环, 使催化效率改进 10 倍。

3 为酶的定向进化研制的仪器及测定技术

酶的定向进化对结构—功能研究而言, 每个基因中 1~2 个核苷改变(一个氨基酸变化)是特别理想的。而对于定向进化研究而言, 每个基因中 2~7 个核苷改变(1~4 个氨基酸变化)是经常使用的。Daugherty 等^[50]发展的用于酶的定向进化实验的 GeneMorph 成套仪器, 可以针对特殊应用选择突变频率。GeneMorph 成套仪器是高效、快捷的酶定向进化实验设备。

创造具有特殊性能的生物催化剂为目的的高通量筛选, 是以定向进化为手段, 创造或修饰酶的所有实验中的关键技术。Reymond 等^[51]发展了一系列的以荧光产物敏感技术为核心的酶测定方法, 提供了测定手性分子中在化学上不活泼的功能基团的新手段, 这些方法具有无先例的敏感性和选择性。这些分析方法适用于微滴定板和高度小型化装置。也可以用过渡态类似物免疫库筛选的方式, 分离具有特殊催化性能的抗体。

4 结语

酶的定向进化是用于解决酶工程中重大问题的关键技术。在酶的定向进化方面仍然有许多工作要做, 在酶的性质改进上还主要集中在某一单一性质上, 如耐热、耐有机溶剂、旋光异构选择性等。再如许多天然酶是固定在膜上, 有些酶需要辅助因子或复杂的辅助蛋白, 已有的研

究成果尚缺乏处理这些复杂情况的成功方法。显然只有通过产生分子多样性的创新策略和高通量筛选技术,才能使进化产生多功能酶成为可能,进而建立起完整、高效的生物合成途径。另一方面,将生物催化剂用于工业用途的手段和方法的创新研究也是必要的。

酶的定向进化使酶的催化性能达到和接近工业用途的要求逐渐成为可能,近年来的研究工作已经取得了非常显著的进展,使人们看到了获得适于工业用途的生物催化剂的曙光,但是要真正达到这一点,仍然需要新的理论与技术的突破。

参考文献

- [1] W R Cannon, S F Singleton, S J Benkovic. *Nature Structural Biology*, 1996, 3: 821~833.
- [2] O Kirk, I V Borchert, C C Fuglsang. *Curr. Opin. Biotech.*, 2002, 13: 1~7.
- [3] I P Petrounia, F H Arnold. *Current Opinions in Biotechnology*, 2000, 11: 325~330.
- [4] I N A Ashie. *Food Technology*, 2003, 57(1): 44~51.
- [5] W W Duckworth, W D Grant, B E Jones. *FEMS Mikrobiol Ecol*, 1996, 19: 181~191.
- [6] T Wiederkehr, B Bukau, A Buchberger. *Current Biology*, 2002, 12: 26~28.
- [7] F H Arnold. *Acct. Chem. Research*, 1998, 31, 125~131.
- [8] L Holm, C Sander. *Proteins Struct. Funct. Genet.*, 1997, 28: 72~82.
- [9] E P Garvey, C R Mattheis. *Biotechnology*, 1990, 14: 37~63.
- [10] G L Moore, C D Maranas. *J. Theor. Biol.*, 2000, 205: 483~503.
- [11] W P C Stemmer. *USP*: 5,605,793, 1997.
- [12] M E Black, T G Newcomb, H M Wilson et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93: 3525~3529.
- [13] W P C Stemmer. *Nature*, 1994, 370: 389~391.
- [14] F H Arnold. *Nat. Biotechnol.*, 1998, 16: 617~618.
- [15] M D van Kampen, N Dekker, M Egmond et al. *Biochemistry*, 1998, 37: 3459~3466.
- [16] L Patthy. *Gene*, 1999, 238: 103~114.
- [17] Z Shao, H Zhao, L Giver et al. *Nucl. Acids. Res.*, 1998, 26: 681~683.
- [18] M Osetmeier, A E Nixon, S J Benkovic. *Bioorganic Med. Chem.*, 1999, 7: 2139~2144.
- [19] H Murakami, T Hoshaka, M Siso. *Nature Biotechnol.*, 2002, 20: 76~81.
- [20] S Lutz, M Osetmeier, G L Moore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98: 11248~11253.
- [21] V Sieber, C A Martinez, F H Arnold. *Nature Biotechnol.*, 2001, 19: 456~460.
- [22] H Zhao, L Giver, Z Shao. *Nature Biotechnol.*, 1998, 16: 258~261.
- [23] E Mössner, A Plückthun. *Chimia*, 2001, 55(4): 324~328.
- [24] D Wahler, J L Reymond. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2001, 5: 152~158.
- [25] S A Benner. *Chem. Rev.*, 1989, 89: 789~806.
- [26] M M Altamirano, J M Blackburn, J M Aguayo. *Nature*, 2000, 403: 617~622.
- [27] T Kichise, S Taguchi, Y Doi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68(5): 2411~2419.
- [28] A Witkowski, A K Joshi, Y Lindqvist et al. *Biochemistry*, 1999, 38(36): 11643~11650.
- [29] M Zaccolo, E Gherardi. *J. Mol. Biol.*, 1999, 285: 775~783.
- [30] F C Christians, C A Scapozzal. *Nat. Biotechnol.*, 1999, 17: 259~264.
- [31] M Wada, C C Hsu, D Franke. *Bioorg. Med. Chem.*, 2003, 11: 2091~2098.
- [32] S Fong, T D Machajewski, C C Mak et al. *Chem. Biol.*, 2000, 7: 873~883.
- [33] O May, P T Nguyen, F H Arnold. *Nat. Biotechnol.*, 2000, 18: 317~320.
- [34] R Cannio, P Contursi, M Rossi et al. *Extremophiles*, 2001, 5(3): 153~159.
- [35] T J Kaper, S J J Brouns, A C M Geerling et al. *Biochem. J.*, 2002, 368: 461~470.
- [36] H Komeda, N Ishikawa, Y Asano. *J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2003, 21: 283~290.
- [37] J K Song, J S Rhee. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1547: 370~378.
- [38] J C Moore, H M Jin, O Kuchner et al. *J. Mol. Biol.*, 1997, 272: 336~347.
- [39] J K Yang, M S Park, G S Waldo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100: 455~460.
- [40] M T Reetz, K E Jaeger. *Chemistry A European Journal*, 2000, 6: 407~412.
- [41] G J Williams, S Domann, A Nelson. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100(6): 3143~3148.
- [42] D Hilvert. *Ann. Rev. Biochem.*, 2000, 69: 751~753.
- [43] P J Wentworth, K D Janda. *Cell Biochem. Biophys.*, 2001, 35: 63~87.
- [44] N Takahashi, H Kakinuma, L Liu. *Nat. Biotechnol.*, 2001, 19: 563~567.
- [45] I P Petrounia, F H Arnold. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2000, 11: 325~330.

- [46] S K Powell, M A Kaloss, A Pinkstaff. *Nat. Biotechnol.*, 2000, 18: 1279~1282.
- [47] E T Boder, K S Midelfort, K D Wittrup. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97: 10701~10705.
- [48] G L Moore, C D Maranas, S Lutz. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98: 3226~3231.
- [49] C T Sandro, L Dimitrios, H Annemarie. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(6): 679~685.
- [50] P S Daugherty, C Gang, B L Iverson. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97: 2029~2034.
- [51] J L Reymond. *Chimia*, 2001, 55: 1049~1052.