

目 錄

目錄.....	1
中文摘要.....	5
英文摘要.....	8
前言.....	11
一、 蛋白分解 (Proteases).....	11
二、 <i>Bacillus stearothermophilus</i>	15
三、 Leucine aminopeptidases (LAPs).....	16
四、 過氧化氫對酵素穩定性之影響.....	17
五、 拉曼光譜學(Raman spectroscopy)在生化上之應用.....	18
六、 金屬 切割 (Metallopeptidases).....	20
七、 酵素催化機制之研究.....	23
八、 論文研究方向.....	24
材料與方法.....	26
一、 藥品.....	26
二、 菌株、質體及培養條件.....	26
三、 <i>E. coli</i> 質體 DNA 的抽取.....	27
四、 <i>B. stearothermophilus</i> 染色體 DNA 之抽取.....	29
五、 DNA 的洋菜膠體電泳分析.....	29
六、 DNA 片段之回收與純化.....	30
七、 聚合 鏈鎖反應.....	31

八、 DNA 黏接反應.....	32
九、 質體的轉形作用.....	32
十、 表現載體之構築.....	32
十一、 重組 <i>B. stearothermophilus</i> 白胺酸 胺基切割 II (rLAPII)之純化.....	33
十二、 蛋白質的電泳分析.....	34
十三、 rLAPII 之活性分析.....	35
十四、 定點突變法.....	37
十五、 酵素之氧化穩定性及對過氧化氫之抗性.....	39
十六、 氧化酵素次級結構之拉曼光譜儀分析.....	39
十七、 鈷離子親合性.....	39
十八、 EDTA 處理之酵素再活化反應.....	39
十九、 酵素動力學參數之測定.....	40
結果.....	42
一、 rLAPII 的大量表現及純化.....	42
1. <i>B. stearothermophilus</i> LAP II 基因之選殖	
2. IPTG 誘導之最適濃度與時間	
3. 酵素之純化	
二、 rLAPII 的特性分析.....	43
1. pH 值及溫度對酵素活性之影響	
2. 酵素對受質的選擇性	

3. 金屬離子與化學試劑對酵素活性之影響	
三、 酵素中甲硫胺酸(methionine)殘基經定點突變後對過氧化	
氫之抗性.....	44
1. 過氧化氫對 rLAPII 之影響	
2. 突變基因之表現與酵素純化	
3. 酵素之氧化穩定性	
4. 酵素比活性與動力學特性	
四、 探討天門冬酸(aspartic acid)殘基在酵素催化作用中扮演	
的角色.....	46
1. 突變基因之表現與酵素純化	
2. 酵素比活性與動力學特性	
3. Asp 變異酵素之鈷離子親合性	
4. EDTA 處理後 Asp 變異酵素之再活化作用	
五、 探討組織胺酸(histidine)殘基在酵素催化作用中扮演	
的角色.....	47
1. 突變基因之表現與酵素純化	
2. 酵素比活性與動力學特性	
3. His 變異酵素之鈷離子親合性	
4. EDTA 處理後 His 變異酵素之再活化作用	
六、 天門冬酸與組織胺酸殘基第二次突變之分析.....	
1. 變異酵素之鈷離子親合性	

2. EDTA 處理後變異酵素之再活化作用	
討論.....	49
一、 rLAPII 之純化與生化特性.....	49
二、 酵素中 Met 殘基經定點突變後對過氧化氫之抗性.....	51
三、 天門冬酸(aspartic acid)殘基在酵素催化作用中所扮 演的角色.....	52
四、 組織胺酸(histidine)殘基在酵素催化作用中所扮演 的角色.....	53
參考文獻.....	55
圖表目錄.....	61
附錄.....	89
個人資料.....	96

中文摘要

白胺酸 胺基切割 是一種 外切 ，可自 鏈的 N 端將白胺酸殘基移除。本研究將 *Bacillus stearothermophilus* NCIB 8924 之白胺酸

胺基切割 II 基因選殖到表現載體 pQE32 上，並且利用 T5 啟動子的調節來進行基因表現。此攜帶 6 個 His 標記之酵素以鎳離子螯合的層析分離法進行均質純化後，可得到具有 425 U/mg 比活性及回收率達 76% 的蛋白質。此純化蛋白質之次單位利用 SDS-PAGE 測得的分子量為 44.5 kDa；其最適操作溫度、pH 值分別是 60°C 與 8.0。Co²⁺ 對此重組型酵素具有增強效應；而 Cu²⁺、Hg²⁺ 和 DTT、EDTA 等金屬螯合劑則對其具有強烈的抑制作用。經 EDTA 處理後的失活酵素可由 Co²⁺ 刺激而恢復活性，由此可知其為 Co²⁺ 依賴型的金屬酵素。綜觀以上生化特性，我們發現此重組型白胺酸

胺基 切割 II (rLAPII) 與其原生型具有極明顯的相似性。

氧化穩定性的分析顯示，rLAPII 對於 H₂O₂ 所造成的氧化傷害會隨著溫度上升而增加感受性。經 300 mM H₂O₂ 處理的酵素，其二級結構有明顯的改變。為了探討 Met 殘基在酵素活性受氧化作用抑制的過程中所扮演的角色，我們將 rLAPII 的 5 個 Met 殘基以定點突變法置換成 Leu，純化後得到 M_r 值為 44.5 kDa 的突變酵素。Met82Leu、Met88Leu、Met254Leu 及 Met382Leu 等突變酵素的比活性與野生型相似；而則 Met136Leu 降低。動力學參數顯示，Met136Leu 的 k_{cat} 值減少了 47%，因此催化效率 (k_{cat}/K_m) 也降低了 50%。所有 Met 突變酵素都比野生型酵素對氧化劑敏感。由此可知，

B. stearothermophilus LAPII 的 Met 殘基在氧化反應中具有保護酵素的功能。

金屬 胺基切割 依其催化作用之類別共分為 33 個家族，白胺酸 胺基切割 為 M29 家族的成員之一，其與金屬結合的胺基酸殘基至今仍不清楚。為了想進一步探討此酵素之 Co^{2+} 結合部位，經比對了不同之 胺基切割 的胺基酸序列後，找出一些可能與酵素活性有關的高保留區胺基酸殘基。在 rLAPII 中，我們挑出 Asp-61、Asp-180、Asp-308、Asp-339、Asp-380、Asp-391、Asp-396、His-191、His-227、His-345 和 His-378 等殘基進行定點突變。其中，7 個 Asp 殘基被置換成 Ala，而 4 個 His 殘基則被置換成 Leu。酵素活性分析方面，Asp380Ala、His345Leu 和 His378Leu 三者均無活性表現；而 Asp61Ala 與鈷離子的親合性明顯降低。動力學參數顯示，其他突變型酵素的 K_m 值皆比野生型酵素增加 30% 以上。在 k_{cat} 值的比較中，Asp391Ala、Asp396Ala、His191Leu 和 His227Leu 四者均增加；而 Asp339Ala、Asp61Ala 和 Asp308Ala 則降低了 40% 至 60%。Asp61Ala 之催化效率(k_{cat}/K_m)降低達 83% 之多，Asp308Ala 和 Asp339Ala 也降低了 70%，Asp-180、Asp-391、Asp-396、His-191 和 His-227 的催化效率並無明顯差異。以 EDTA 處理酵素後，我們發現野生型、Asp180Ala、Asp308Ala、Asp339Ala、Asp391Ala、Asp396Ala、His191Leu 和 His227Leu 等在添加 CoCl_2 後可恢復酵素活性。經 EDTA 處理的 Asp61Ala 變異酵素之活性恢復情形很不明顯；但是 EDTA 處理的 Asp61Glu 酵素活性恢復則明顯可見。此外，apo-Asp380Ala、apo-His345Leu、apo-His345Arg、apo-His378Leu 及

apo-His378Arg 在添加 CoCl_2 後仍無法恢復酵素活性。根據以上結果推測，Asp-61 的羧基支鏈可能在鈷離子結合上扮演重要角色，而 Asp-380、His-345 和 His-378 則可能為酵素結構之關鍵胺基酸。

Abstract

Leucine aminopeptidases (LAPs) are exopeptidases that remove the N-terminal L-leucine from peptide substrates. For expression of *Bacillus stearothermophilus* NCIB 8924 leucine aminopeptidase II (LAP II) in *Escherichia coli* regulated by a T5 promoter, the gene was amplified by polymerase chain reaction and cloned into expression vector pQE-32 to generate pQE-LAPII. The His₆-tagged enzyme was overexpressed in IPTG-induced *E. coli* M15 (pQE-LAPII) as a soluble protein and was purified to homogeneity by nickel-chelate chromatography to a specific activity of 425 U/mg protein with a final yield of 76%. The subunit molecular mass of the purified protein was estimated to be 44.5 kDa by SDS-PAGE. The temperature and pH optima for the purified protein were 60°C and 8.0, respectively. Under optimal condition, the purified enzyme showed a marked preference for Leu-*p*-nitroanilide, followed by Arg- and Lys-derivatives. The His₆-tagged enzyme was stimulated by Co⁺² ions, but was strongly inhibited by Cu⁺² and Hg⁺² and by the chelating agents, DTT and EDTA. The EDTA-treated enzyme could be reactivated with Co⁺² ions, indicating it is a cobalt-dependent exopeptidase. Taking the biochemical characteristics together, we found that the recombinant LAPII (rLAPII) exhibits significant similarities from those properties described for the native enzyme.

Oxidative stability assay showed that the rLAPII was sensitive to oxidative damage by hydrogen peroxide at the elevated temperature. The H₂O₂-treated enzyme experienced obvious changes in the secondary structure when the oxidant concentration increased to 300 mM. To investigate the role of methionine residues on the oxidative inactivation, each of the five methionine residues in the rLAPII was replaced with leucine by site-directed mutagenesis. The mutant enzymes with an apparent M_r of approximately 44.5

kDa. The specific activities for Met82Leu, Met88Leu, Met254Leu, and Met382Leu were similar to that of the wild-type enzyme, whereas a reduced activity was observed in Met136Leu. The 50% decrease in the catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) for Met136Leu was caused by 47% decrease in k_{cat} value. As compared with the wild-type enzyme, all mutant proteins were more sensitive to the oxidant, implying that the methionine residues of *B. stearothermophilus* LAP II are important for the protection of the enzyme from oxidative inactivation.

Metallopeptidases form the most diverse of the catalytic types of peptidases, about 33 families being recognized. LAP is a member of family M29 of metallopeptidases, and the metal-binding residues remain unknown. In order to identify the Co^{2+} -binding domain, we performed the alignment of amino acid sequence of LAPs from different microorganisms to determine the conserved amino acid residues, which might be essential for enzyme activity. The conserved amino acid residues of rLAPII include Asp-61, Asp-180, Asp-308, Asp-339, Asp-380, Asp-391, Asp-396, His-191, His-227, His-345 and His-378 were changed by site-directed mutagenesis. Replacement of 7 Asp residues with Ala and 4 His residues with Leu. There is no enzymatic activity were detected in Asp380Ala, His345Leu and His378Leu. Co^{2+} affinity of Asp61Ala was decreased obviously. The K_m values for the other mutants were increased more than 30% by comparison with wild-type enzyme. The k_{cat} values for Asp391Ala, Asp396Ala, His191Leu and His227Leu were increased, while k_{cat} decreased 40 to 60% for Asp339Ala, Asp61Ala and Asp308Ala. The 83% decreased in the catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) for Asp61Ala and the 70% decreased was exhibited by Asp308Ala and Asp339Ala. Alterations in Asp-180, Asp-391, Asp-396, His-191 and His-227 did not cause a significant difference on the catalytic efficiency. The EDTA-treated enzyme experienced obvious reactivation in the wild-type, Asp180Ala, Asp308Ala,

Asp339Ala, Asp391Ala, Asp396Ala, His191Leu and His227Leu by CoCl_2 addition. The significant reactivation of EDTA-treated Asp61Glu was observed, while the reactivation of EDTA-treated Asp61Ala was feebly. Moreover, apo-Asp380Ala, apo-His345Leu, apo-His345Arg, apo-His378Leu and apo-His378Arg could not restore the LAP activity by CoCl_2 addition. Based on these results, it is suggested that the carboxyl group of Asp-61 may be play an important role in cobalt-binding, while Asp-380, His-345 and His-378 were the putative essential residues for enzyme structure.

前 言

一、 蛋白分解 (Protease)

蛋白質用於食品配方中可以賦予及強化食品之功能，如當風味調味料以增強食物香味；或當營養補充劑以使人恢復體力。做為功能性之食品添加劑，蛋白質必須先經過修飾才能符合所需。以營養補充劑而言，完整的蛋白質分子不像小分子之雙或三肽容易有效和快速地被人體吸收 (Frokjaer, 1994)。主要的原因包括：1) 短肽的滲透壓較胺基酸低，除了避免腸胃的不適之外，也可以提高吸收效率；2) 人體小腸壁對短肽的通透性較胺基酸為高；3) 短肽的風味也較胺基酸容易被接受；以及4) 短肽一般較蛋白質的抗原性低，不容易產生過敏的現象，因此蛋白質須先經酵素水解成短肽後才能提高其利用率。做為風味調味劑時，蛋白質更須分解成短肽、胺基酸，以利加工處理後產生特殊的風味。酵素對蛋白質之水解作用使蛋白質具有分子量降低、離子性官能基數目增加和疏水性官能基曝露出來等特性。這些特性使得蛋白質的官能性質產生變化，因而達到改善乳化效果、增加保水性及膳食時易為人體消化和吸收等目的。

1. 蛋白分解 之分類

蛋白分解 可分為兩大類：(1) 內切 (endopeptidase)：是從蛋白質內部的肽鍵進行任意的水解，通常得到較大分子量的肽產物，如 pepsin、trypsin、chymotrypsin 及 rennin 等均屬此類。(2) 外切 (exo-peptidase)：則是從蛋白質的 N 端或 C 端進行有系統的肽鍵水解，可

以得到游離胺基酸與小分子的產物(Rao *et al.* 1998)。一般而言，蛋白質的水解，首先是經 endopeptidase 水解成小片段，然後再經由 exopeptidase 水解成更小的胺基酸。內切與外切的使用可以在水解開始時一起加入反應，但其水解效果在相同的酵素活性下，通常不如內切先行水解一段時間後，再添加外切繼續進行水解。Clemente 等人(1999)利用內切和外切的協同作用來製造雞豆蛋白質水解物時，就是先用內切讓水解率到達 20%以上時，在添加外切水解至產物的水解率達 50%。

此外，Exopeptidase 又可分為：從靠近游離 C 端之鏈切割者稱為 carboxypeptidase，如 carboxypeptidase A、carboxypeptidase B 及 carboxypeptidase Y 等；從靠近游離 N 端之鏈切割者稱為 aminopeptidase，如 leucine aminopeptidase (LAP) 及 proline aminopeptidase 等(Chao *et al.* 2000)。

2. 蛋白分解的生理功能與應用

蛋白分解在生理作用及病理發展上扮演著重要的角色(Rao *et al.* 1998)，舉凡蛋白質的分解、血球凝集、細胞生長與轉移、組織排列、形態發育過程、發炎反應、釋放荷爾蒙和分泌型蛋白質的運輸等過程，都有蛋白分解的參與。

蛋白分解的應用範圍極廣，包括清潔劑製造業、皮革工業、食品工業和製藥業等。根據 1996 年 Goldfrey 和 West 的統計，全球工業用酵素的

銷售值一年將近有十億美元，其中蛋白分解 即佔了 60% 之多。在食品產業的眾多調味料產品中，蛋白質及其分解衍生物是關鍵的呈味成分。由醬油、調味醬、調味汁、高湯，到所謂風味調味料等，其中都很容易找到大量的蛋白質及其分解衍生物，尤其是 和胺基酸。傳統上，許多調味料都是以發酵方式製造。在發酵過程中，由微生物所分泌的蛋白分解 及 切割 將平淡無味的蛋白質分解成具有口感較好的 及胺基酸成分。這其中，雖然 可能本身沒有明顯的呈味特性，但在與胺基酸及其他呈味成分混合存在下，會有顯著的輔助效果。近幾十年來，由於商業化蛋白分解 的普及，利用蛋白分解 來分解蛋白質物質以製造調味料的產品也越來越多，頗有與傳統發酵調味料分庭抗禮之勢。

蛋白質酵素水解物中含有特定胺基酸組成與分子量大小的短鏈 ，相當適合於某些醫療飲食的配方，比僅僅是胺基酸混合物的產品有其優越之處。蛋白質酵素水解物已經應用在許多方面，包括營養補充作用的能量飲料、老年人營養產品、運動員補給品，與體重控制飲食等；以及具有醫療調養功效的減敏嬰兒配方產品和針對苯酮尿患者、急慢性肝病患者、腹瀉症患者，與潰瘍性結腸炎患者等(Clemente, 2000)。

3. 具有生物活性的

生物活性 的生產，主要有兩種方式：一種為合成的方式；另一種則為酵素水解的方式。利用合成的方式，目前有化學合成法與酵素性合成法。化學合成法有固相與液相兩種方式，操作過程雖然不同，但化學原理

幾乎是一樣的。化學合成法因大量使用有機溶劑，環境影響堪憂、且價格昂貴，故多半使用於實驗室規模。酵素性合成法的反應比較溫和，使用的藥品毒性低；然而缺乏合適的酵素，酵素在有機溶劑中的特性尚未完全明瞭，產量過低且成本過高等缺點，再再限制了酵素性合成法的廣泛應用(Gill *et al.*, 1996)。不過，利用廉價的蛋白原料，經由水解酵素，來生產高價位的生物活性，仍是目前最有潛力的生產方式。而未來發展的趨勢，除了積極找尋合適的原料之外，也利用分子生物學的原理及基因工程的技術，修改蛋白質的胺基酸序列，以提高生物活性的產率和效能。

從化學結構與功能來看，生物活性大概是最複雜且功能最廣的物質。大致可分為抗菌及抗病毒、神經活性、酵素調節及抑制、荷爾蒙及荷爾蒙調節、免疫活性、呈味、抗氧化，與營養性等幾類(Gill *et al.*, 1996)。

4. 苦味的去除

苦味主要是由疏水性胺基酸所組成的，解決之道可利用有機溶劑(secondary butyl alcohol、aqueous ethanol 或 aqueous isopropanol) (Lalasis, 1978)，以及疏水性作用的層析法(hydrophobic interaction chromatography)將苦味萃取出來。此外，有人利用 exopeptidase 去除酪蛋白水解液的苦味，結果發現游離的胺基酸(arginine、lysine、histidine、tyrosine、phenylalanine、leucine 或 glutamine)增加了。因此猜測，去除端點的特定胺基酸，可降低蛋白質水解液苦味的產生(Ney and Retzlaff, 1985)(見附圖

一)。也有人利用 aminopeptidase P 將苦味的 proline 切除，以去除酪蛋白水解液中的苦味(McDonnell *et al.*, 1997)。由於 leucine 會造成 的苦味，而且當 leucine 位於 端點時會產生強烈的苦味，因此有人利用具有 leucine aminopeptidase 活性的酵素，來去除蛋白質水解液中的苦味(Minamiura *et al.*, 1972；Tan *et al.*, 1993)。未來在食品加工的處理上，苦味的去除，仍傾向於使用酵素的方法，特異性(specific)的去除疏水性胺基酸、鹼性胺基酸和 proline。因此，目前主要的方向就是找尋合適的酵素，並降低其生產成本。

二、 *Bacillus stearothermophilus*

早在 1940 年代就有許多關於嗜熱菌之蛋白分解 的研究報告，而 *B. stearothermophilus* 也以其嗜高溫之特性而廣受學者所研究，自 1957 年 O'Brien 和 Leon Campbell 兩人發表 *B. stearothermophilus* 之蛋白分解 純化後，其他菌株生產的蛋白分解 即不斷地被發表，且廣泛應用於食品工業上。Zuber 和 Roncari 於 1967 年發表指出 *B. stearothermophilus* 可產生三種具熱穩定性的 胺基外切 (aminopeptidase)，分別是 AP I、AP II 和 AP III。其中 AP I 的耐熱性最好，高達 80°C，此酵素位於細胞膜上，為膜連結蛋白的一種。1969 年，Zuber 和 Roncari 於自 *B. stearothermophilus* 中分離出 AP I，隨後更探討此酵素的物化特性。AP I 的分子量高達 400 kD，由 12 個具有 α 和 β 兩種形式的次單位所構成。有關 AP I 的研究報告十分有限，1973 年 Stoll 等人發表 AP I 次單位的 N 端序列，經比對後發現與

AP II 並不具有任何相關性。AP II 和 AP III 為細胞質內的 胺基切割 ，對高溫的耐受性略遜於 AP I，分別由分子量為 46 kD 及 47.5 kD 的次單位所形成的雙體結構(Stoll *et al.*, 1976)。

三、 Leucine aminopeptidases (LAPs)

在許多動植物體的組織及細胞內均可發現此類酵素以不同的型式存在 (Midorikawa *et al.*, 1998)，其中以 leucine aminopeptidases (LAPs; EC 3.4.11.1) 最常見，而有關牛眼水晶體 胺基分解 (bovine lens aminopeptidase) 的研究資料最齊全(Melbye and Carpenter, 1971; Lasch *et al.*, 1973; Kim and Lipscomb, 1994)。在人體之生理功能研究指出 LAPs 在免疫系統上扮演重要的角色(Beninga *et al.*, 1998)；此外，LAPs 能促進抗生素進入細胞中，因此可增加抗癌症之抗生素進入細胞中的量，進而提昇抗癌效果(Mow *et al.*, 2001)。加拿大愛滋病防治中心由愛滋病帶原者中，檢測出其胞內及胞外的 LAPs 活性較一般人來的高，推論 LAPs 可能與 HIV 早期感染階段時病毒穿透力有關，因此當加入 LAPs 的抑制劑 bestatin 時，順利的降低了 HIV 的感染能力(Pulido-Cejudo *et al.*, 1997)。寄生蟲方面的研究顯示 LAPs 的作用在其感染寄主的過程中是極重要的一環(Rhoads and Fetterer, 1998)。至於其他 LAPs 在動物體內之生理功能則尚不明確。

根據 Gonzales 和 Robert-Baudouy (1996) 的歸納整理得知，在 102 種細菌的 胺基外切 中約有 47% 是單體(monomer)結構，大都屬於分泌性的型式。其他 53% 則為複合體(multimer)結構，通常由 2 個、4 個或 6 個相

同的次單位所結合而成；其中較為特殊的兩者一是 *Mycoplasma salivarium* 的 APM_y 乃由 46 和 50 kDa 兩個不同大小的單體結合而成 (Shibata and Watanabe, 1970)；另一個是由 12 個大小完全相同的 36 kDa 次單位結合而成的 *B. stearothermophilus* AP I，它是一個 400 kDa 的大分子酵素 (Roncari and Zuber, 1969；Stoll *et al.*, 1972)。

近年來有關不同之細菌 胺基切割 的結晶學研究報告陸續發表 (Yoshimoto *et al.*, 1993; Conlin *et al.*, 1994; Mitsou *et al.*, 1994)。有些 胺基切割 的三級立體結構 (three-dimensional structure) 則已完成解析，包括：*E. coli* 的甲硫胺酸切割 (methionine aminopeptidase) (Roderick and Matthews, 1988)、牛眼水晶體 胺基切割 (Burley *et al.*, 1990) 和 *Aeromonas proteolytica* 的 胺基切割 (Schalk *et al.*, 1992) 等。而經多篇研究報告得知牛眼水晶體 胺基切割 的金屬離子結合位置是 Lys-250、Asp-255、Asp-273、Asp-332 及 Glu-334 (Burley *et al.*, 1992; Taylor, 1993b; Strater and Lipscomb, 1995)；儘管如此，仍有許多 胺基切割 的立體結構尚待解答。

四、過氧化氫對酵素穩定性之影響

大部分的酵素在可以形成高氧化自由基 (reactive hydroxyl radicals) 之金屬催化氧化系統 (metal-catalyzed oxidative system) 中將失去活性 (Stadtman, 1993)，而常發生氧化反應之位置為蛋白質的 lysine、cysteine 和 methionine 等殘基 (Vogt, 1995)。Methionine 之氧化為內生性 (endogenous) 或

環境產生氧化劑所造成蛋白質傷害之重要氧化型態(Stadtman, 1992)，methionine 殘基可被過氧化氫氧化成 methionine sulfoxide 或在反應更劇烈的條件下轉變成 methionine sulfone (見附圖二)。報導指出，雖然 methionine 殘基之氧化對某些蛋白質沒有影響(Keck, 1996)，但更多證據顯示該殘基之氧化會導致蛋白質失去活性(Teh *et al.*, 1987)，例如來自 *Bacillus sp.* (Hayes *et al.*, 1998)的 acid-soluble spore proteins，以及 *Rhodospirillum rubrum* 的 light-harvesting complex (Wang *et al.*, 2001)等，在 methionine 殘基氧化之後，蛋白質會失去活性。但是也有因為 methionine 氧化而使得蛋白質生理活性增加，例如 *Trichoderma reesei* (Kachurin *et al.*, 1995) 的 α -galactosidase，或者如 α_2 -plasmin inhibitor 在結構及活性上並沒有明顯改變(Johnson and Travis, 1979)。有些研究顯示將 methionine 殘基以對氧化具有抗性之胺基酸取代，則可增加蛋白質的抗氧化性，例如 subtilisin (Bott *et al.*, 1988; Estell *et al.*, 1985)、 α_1 -antitrypsin (Rosenberg *et al.*, 1984)及 D-amino acid oxidase (Ju *et al.*, 2000)。因此，Torben 等人(1995)曾利用選位突變方式改變 *B. licheniformis* α -型澱粉 的七個 methionine 殘基，結果發現 Met197Leu 變異株對過氧化氫之抗性提高，且酵素活性及穩定性也增加。

五、拉曼光譜學及其在生化上的應用

拉曼(Raman)光譜是導源於光的散射而造成的。當入射光被偏折後便造成散射，這是因為入射光的電磁波的電場向量與物質本身的電子交互作用而導致光的散射。此交互作用引起電子的週期性振動，隨伴產生振盪電矩

(electric moment)，振盪的電子為放射輻射新的來源，即散射光的來源。散射現象可分為三種：一、彈性散射，其頻率與入射光相等，稱為瑞來(Rayleigh)散射；二、低頻率的非彈性散射，其散射頻率低於入射光，稱為史托克拉曼(Stokes Raman)散射；三、高頻率的非彈性散射，其散射頻率高於入射光，稱為反-史托克拉曼(anti-Stokes Raman)散射(Freeman, 1974)。

對人類而言，瑞來散射是最為熟悉的，我們之所以能看見各種物體即肇因於光的瑞來散射。由實驗得知散射效率與波長的四次方成反比。太陽光中的藍光波長比紅光短，因此它比紅光更容易散射。我們看晴天天空是藍色的，即因為藍光是陽光在空氣中的主要散射成分。反之在清晨或黃昏時，太陽光必須穿透較厚的大氣層才到達我們眼中，而此時大多數的藍光已被空氣分子所散射，所剩餘的橙紅光線才進入我們眼中。相對於瑞來散射，拉曼散射在我們日常生活中較不易察覺，可是對科學家來說，它對於研究分子振動和轉動十分有用。拉曼散射涉及兩種能量相異的光子，即入射光子與散射光子，此能量差是因為分子與入射光子相互作用，而使分子的振動或轉動狀態改變。也基於此種特性，拉曼光譜成為研究分子振動光譜的利器之一。

近十多年來，拉曼光譜學已被廣泛應用於生化上的研究(Tu, 1982)。其研究的對象包括蛋白質、核酸、核蛋白、脂質、細胞膜、碳水化合物、類胡蘿蔔素(carotenoid)、黃素(flavin)與金屬離子在生物中的角色等。對生化分子如何判定拉曼光譜的振動頻率代表的意義，經常是利用與它結構相近的模型化合物的光譜頻率互相比較而定的。

蛋白質是由多種胺基酸組成的巨大分子，具有複雜的三度空間結構。沒有一種單獨的物理方法能解出蛋白質的全部結構。X 光繞射對於構造解析固然是非常有用的工具，卻局限於晶體物質，而自然狀態的蛋白質是以水溶液存在，晶體的蛋白質結構與水溶液中的蛋白質很可能不全相同。圓光旋差(circular dichroism，簡稱 CD)對於水溶液中蛋白質內各種胺基酸之間的骨架(如 α -螺旋和 β -褶片)也是一種研究利器。可是它對蛋白質的支鏈和雙硫鍵無法作有效的偵測。拉曼光譜方法對於待測物是晶體、粉末、凝膠或水溶液皆適用，對於蛋白質的骨架、雙硫鍵與支鏈(酪胺酸、色胺酸及甲硫胺酸等)也都能提供有用的訊息。

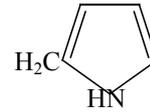
六、金屬切割 (Metallopeptidase)

金屬離子在蛋白質構造上扮演著重要的角色，例如強化蛋白質執行生物功能過程中所需的結構穩定性，以及參與酵素的催化作用。金屬離子可活化化學鍵結而使其易於進行反應，與大分子結合並影響其結構的特異性改變機制。因此，金屬離子結合於酵素的活化中心是決定酵素活性表現的關鍵所在。

1. 蛋白質內金屬離子的結合位置

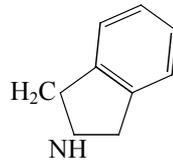
帶正價電荷的金屬離子具有電子親合性，可提供電子對在電荷-電荷交互作用中形成鍵結。蛋白質中與金屬離子結合的主要胺基酸支鏈有：1) 羧基類，如天門冬酸(aspartic acid, CH_2COO^-)和醯胺天門冬酸(glutamic acid,

CH₂CH₂COO⁻); 2) 咪唑基類, 如組織胺酸(histidine,



); 3) 吲哚

基類, 如色胺酸(tryptophan,



); 4) 硫醇類, 如半胱胺酸(Cysteine,

CH₂SH); 5) 硫醚基類, 如甲硫胺酸(CH₂CH₂SCH₃); 6) 羥基類, 如絲胺酸

(serine, CH₂OH)、酥胺酸(threonine, CH(CH₃)OH)和酪胺酸(tyrosine,

CH₂-C₆H₄-OH)等(Glusker, 1991)。附圖三以 *Streptomyces griseus* AP 的活性

中心為例, 顯示天門冬酸和醯胺天門冬酸的羧基以及組織胺酸的咪唑基,

與金屬離子結合後共同形成一個具有強親核力的催化劑。而當金屬離子與

其配位體(ligands)結合後, 因所結合的配位體數目而形成各種不同的排列

方式(He *et al.*, 1990)(附圖四)。

2. 金屬 切割 的分類

在 切割 的催化機制中最常見的就是金屬依賴型酵素, 它們大致分為 33 個家族(families) (Barrett, 1994), 可簡寫為 M1~M33。其中 17 個家

族為 內切 , 12 個家族為 外切 , 以及 1 個家族含括有 內切

和 外切 。超過半數的酵素具有一段 His-Glu-Xaa-Xaa-His (HEXXH)

的功能區(motif), 在某些酵素的 X 光結晶解析中顯示, 此功能區形成 Zn²⁺

離子結合位置的一部分。1995 年, Rawlings 和 Barrett 兩人又將 33 個家族

依其與金屬離子結合的配位體種類區分為五群(groups): 1) 具有 HEXXH

+E (glutamic acid 為 Zn²⁺ 離子結合的配位體)的功能區者, 如 M4、M5、

M13、M1 和 M2 等家族; 2) 具有 HEXXH+H (histidine 為 Zn²⁺ 離子結合

的配位體)的功能區者，如 M12、M10、M11 和 M7 等家族； 3)其他具有 HEXXH 功能區，但不清楚 Zn^{2+} 離子結合的配位體者，如 M3、M6、M8、M9、M31、M26、M27、M30 和 M32 等家族； 4)不具有 HEXXH 功能區，但已知道其金屬離子結合的配位體者，如 M16、M14、M15、M17 和 M24 等家族； 5)尚未有足夠的證據顯示其金屬離子結合的配位體者，如 M18、M19、M20、M22、M23、M25、M28、M29 和 M33 等家族。由此可知， Zn^{2+} 依賴型酵素所佔的比例最高，1994 年 Hooper 的研究報告中更把此類酵素稱為 Zincins。

3. Aminopeptidase T 家族

根據 1997 年 Motoshima 等人對 *B. stearothermophilus* 的 APII、*Thermus aquaticus* 的 aminopeptidase T (簡稱 AP-T)及 *T. thermophilus* HB8 的 aminopeptidase Th (簡稱 AP-Th)之序列比對顯示(附圖五)，AP Th 與 AP T 在 N 端的胺基酸序列上有 84%的相似性；而 AP II 與 AP T 則有 43%的相似性，於是將這三種酵素歸為 Aminopeptidase-T 家族，簡稱 AP-T 家族。爾後 Rawlings 和 Barrett 兩人依其催化特性遂將此家族列為金屬酵素中的 M29 家族。同時依據與 leucyl aminopeptidase 家族活性中心之序列比對，也傾向於將 AP-T 家族歸類為 leucyl aminopeptidase 家族的成員之一。1999 年 Fernandez-Espla 和 Rul 的研究指出，*Streptococcus thermophilus* 的 PepS 與 APII 具有 43%相似度，與 AP-T 有 41%相似度，與 AP-Th 有 40%的相似度，而與 *B. subtilis* 的 APS 則有 50%的相似度。將它們的 C 端進行比對

(附圖六)發現，*S. thermophilus* 的 PepS 與 APII、APS 以及 AP-T 等酵素具有高相似度，因此將 *S. thermophilus* 的 PepS 也歸類於 AP-T 家族；但不建議把 *S. thermophilus* 的 PepS 列為 leucyl aminopeptidase 家族的成員。截至目前為止，雖然清楚 M29 酵素的活性表現必須依賴鈷離子，但其與金屬結合的配位體胺基酸殘基則有待進一步釐清。

4. 鈷-蛋白質(cobalt proteins)

1999 年，Kobayashi 和 Shimizu 兩人針對鈷-蛋白質整理出一份報告，文中指出目前已知需要 Co^{2+} 離子作為輔助因子的細菌酵素有：*E. coli* 的 methionine aminopeptidase 每個次單位結合 2 個 Co^{2+} 離子、*Pyrococcus furiosus* 的 prolidase 每個次單位結合 1 至 2 個 Co^{2+} 離子、*Rhodococcus* sp. R312 的 nitrile hydratase 每個 α 次單位結合 1 個 Co^{2+} 離子以及 *B. stearothermophilus* 的 APII 每個次單位結合 2 個 Co^{2+} 離子等。附圖七顯示 *E. coli* 的 methionine aminopeptidase 以 Asp97、Asp108、His171、Glu204 和 Glu235 等殘基的支鏈與 2 個 Co^{2+} 離子結合，*R. sp.* R312 的 nitrile hydratase 則以 Cys102、Cys105、Cys107 和 Ser106 等殘基的支鏈與 1 個 Co^{2+} 離子結合。

七、 酵素催化機制之研究

酵素的催化作用主要受幾個關鍵胺基酸支鏈形成的活化中心所控制，這些關鍵胺基酸殘基直接參與產物形成過程中的化學鍵結反應。在 1970 年代，學者用不同的化學試劑來修飾單個胺基酸支鏈以探討酵素的催化機

制，這種方式往往因酵素受到化學性的傷害而喪失活性，因此未必能提供直接而有利的證據顯示出酵素催化中心的關鍵胺基酸殘基(Peracchi, 2001)。1987年，Kunkel 等人提出定點突變法，其原理是將酵素特定的胺基酸殘基進行突變，並在合適的寄主細胞內進行基因表現。這種方式遠比化學修飾法更具專一性，而且對酵素結構所造成的傷害也比較小，是一種快速而簡便又不需要觀察表現型的突變技術，已廣泛應用於多項分子生物的研究中。

此外，藉由各項儀器進行酵素催化機制之研究報告更是不勝枚舉，例如 X 光結晶解析、NMR 分析以及光譜儀分析等。通常是以酵素-受質複合體或酵素-特異性抑制劑複合體形成的結晶進行 X 光繞射解析，例如 *E. coli* 的 methionine aminopeptidase (Roderick and Matthews, 1988)、牛眼水晶體的 leucine aminopeptidase (Burley *et al.*, 1990) 和 *A. proteolytica* 的 胺基切割 (Schalk *et al.*, 1992) 等。

八、 論文研究方向

目標一、重組 *B. stearothermophilus* 白胺酸 胺基切割 II 的大量表現及純化

由於傳統純化蛋白質的方法冗長又費時，為使純化蛋白質方法快速且方便，因此本研究首先將選殖 *B. stearothermophilus* 白胺酸 胺基切割 II 基因 *lap II* 轉殖於 pQE-32 表現載體上，pQE-32 表現系統是在 *E. coli* 細胞內進行基因選殖及重組蛋白質表現之最有潛力的系統之一。該質體含一

受 *lac* 操作子調控之 T5 啟動子和由六個 histidine 組成之親合性尾端，該尾端有利於單一步驟以 Ni²⁺-NTA 樹脂純化重組蛋白質。重組載體 pQE-LAPII 於 *E. coli* M15 細胞內表現時，則要探討 IPTG 之最適濃度與最佳操作溫度的誘導作用。

目標二、重組 *B. stearothermophilus* 白胺酸 胺基切割 II 的特性分析

在完成重組蛋白質的大量表現後，將進行酵素生化特性的分析，包括蛋白質的電泳分析、酵素活性表現的最適溫度、最適 pH 值、受質專一性分析以及不同離子與試劑對酵素活性之影響。

目標三、酵素中甲硫胺酸(methionine)殘基經定點突變後對過氧化氫之抗性

本論文將分析純化後的重組 *B. stearothermophilus* 白胺酸 胺基切割 II 在不同濃度的過氧化氫處理及不同溫度下的活性表現，也要以拉曼光譜儀檢測酵素次級結構的改變。此外，利用定點突變方式改變酵素之 methionine 殘基，包括有 Met82、Met88、Met136、Met254 及 Met382 等五個位置，加以分析變異株之酵素活性、穩定性及對過氧化氫之抗性等。

目標四、探討天門冬酸(aspartic acid)殘基在酵素之催化作用中扮演的角色

天門冬酸(aspartic acid)殘基的支鏈因帶有羧基而易與金屬離子形成鍵結，而其他 胺基切割 的研究顯示，此殘基在酵素活化部位上扮演重要角色。因此，本研究將選定 Asp61、Asp180、Asp308、Asp339、Asp380、Asp391 和 Asp396 等七個殘基進行突變，所得之突變酵素進行比活性、金

屬親合性、動力學參數等分析，以探討天門冬酸(aspartic acid)殘基在酵素之催化作用中扮演的角色。

目標五、探討組織胺酸(histidine)殘基在酵素之催化作用中扮演的角色

組織胺酸(histidine)支鏈的咪唑基(imidazole)在酵素進行催化作用時，具有電荷傳遞的功能，其質子在 pH 7.0 時既可為酸性亦可為鹼性催化劑，因而在酵素催化功能上具有特殊地位。因此，本研究將選定 His191、His227、His345 和 His378 等四個殘基進行突變，所得之突變酵素進行比活性、金屬親合性、動力學參數等分析，以探討組織胺酸(histidine)殘基在酵素之催化作用中扮演的角色。

材料與方法

一、藥品

Luria-Bertani (LB)培養基成分包括 yeast extract、peptone、tryptone 及 agar 等均為 Difco 公司 (Michigan, USA)的產品。洋菜膠(agarose)購自 Vegonia 公司(Morehovelly, USA)。Ni-NTA agarose 購自 Qiagen Inc. (Valencia, CA)。Polyacrylamide electrophoresis 所使用的試劑，如 acrylamide、ammonium persulfate 及 TEMED 購自 Bio-Rad (Hercules, CA)。一般無機鹽類及有機溶劑均為分析級，除非特別標示，均購自 Merck 公司(New Jersey, USA)或 Sigma chemical 公司(Missouri, USA)。核酸限制 及其他 DNA 修飾 (Restriction and modification enzymes)購自 Takara Shuzo Co. (Kyoto, Japan)或美國 Promega 公司。回收純化酵素之樹脂(resin)購自 Novagen 公司。此外，選位突變所使用的 QuikChange site-directed Mutagenesis Kit 套組則購自 Stratagene 公司(California, USA)。

二、菌株、質體及培養條件

本實驗所使用菌株包括 *B. stearothersophilus* NCIB 8924 購自食品工業發展研究所菌種中心，用來製備和構築質體的 *E. coli* Novablue 則購自 Novagen Inc. (Madison, WI, USA)。以 *E. coli* strain M15 (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA)來大量表現重組蛋白質。所使用質體為 pQE32 (QIAexpress System)與表現載體 pREP4 (QIAexpress System)。培養 *B.*

stearothermophilus NCIB 8924 所使用之培養基為 Tryptic soy broth (Trptone 15g, Soytone 5g, NaCl 5g/liter, pH 7.3)，於 45°C 與 150 rpm 下振盪培養。

三、 *E. coli* 質體 DNA 的抽取

1. 小量抽取法

根據 Sambrook *et al.* 的 alkaline lysis 方法抽取質體 DNA。挑單一菌落接種至內含 ampicillin (50 µg/ml) 或其他抗生素之 10 ml 的 LB 液體培養基(含 1% tryptone, 0.5% yeast extract 及 0.5% NaCl)中, 於 37°C 振盪(150 rpm) 培養約 12-14 小時。吸取 1.5 ml 菌液至微量離心管中, 於 4°C 以 12,000 rpm (Sigma 2K15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, Germany) 離心 30 秒, 將菌體離下。去除上清液後, 加入 100 µl 冰的 solution I 【50mM glucose, 25mM Tris-HCl 及 10mM EDTA, (pH 8.0)】, 劇烈振盪使菌體完全懸浮。隨後加入 200 µl solution II (0.2 N NaOH 及 1.0% SDS), 輕輕搖動微量離心管, 使溶液充分混合均勻後, 置於冰上 5 分鐘, 再加入 150 µl 冰冷的 solution III 【60ml 5M potassium acetate, 11.5 ml acetic acid (glacial), 28.5 ml H₂O】, 反覆搖動, 使溶液充分混合均勻後, 置於冰上 5 分鐘。隨後以 12,000 rpm 離心 20 分鐘, 小心吸取上清液至另一個新的微量離心管, 以等體積的 phenol/chloroform (1 : 1) 萃取二次, 萃取後再離心, 所得到的上層液移至另一乾淨無菌之微量離心管, 加入 2 倍體積的 95% 冰凍酒精, 置於

-70°C 冰箱中，使 DNA 沈澱 20 分鐘。於 4°C 以 12,000 rpm 離心 20 分鐘，收集 DNA 沈澱物，沉澱以 70% 冰凍酒精洗滌一次後，放入真空乾燥離心機中，乾燥離心 15 分鐘。乾燥的 DNA 沈澱物以 1X TE buffer(或 dd H₂O) 重新溶解，然後取 2 μl 以 1.0% 洋菜膠體作電泳分析，以確定所抽取的 DNA 是否正確。

2. 大量抽取法

根據 Sambrook 等人(1989)所提出的方法。將菌體接入 10 ml 含抗生素之 LB 培養基中，以 150 rpm 於 37°C 震盪培養 16-18 小時，再取 2.5 ml 至 100 ml 內含抗生素的 LB 培養基中，於 37°C 培養 24 小時。以 5,000 rpm 離心 10 分鐘，丟棄上清液，接著將菌體均勻懸浮在 5 ml solution I 中室溫下放置 5 分鐘，加入 10 ml solution II 並混合均勻，靜置於冰上 10 分鐘，接著加入 7.5 ml solution III 劇烈震盪，隨後靜置於冰上 10 分鐘，以 14,000 rpm 離心 15 分鐘，取出上清液，放入乾淨離心管內，加入二倍量的 95% 酒精，置於 -70°C，15 分鐘，使 DNA 沈澱，隨後於 4°C 以 14,000 rpm 離心 20 分鐘，所得到的 DNA 經真空乾燥後，加入適量的水使其溶解，加入 RNase 至終濃度為 20 μg/ml，於 65°C 中反應 30 分鐘後，加入等體積的 phenol 萃取一次，再以等體積的 phenol/chloroform 萃取數次，最後用同體積的 chloroform 除去殘留的 phenol，加入十分之一體積的 3M sodium acetate 及二倍體積的 95% 酒精置於 -70°C，30 分鐘，隨後於 4°C 以 14,000 rpm 離心

20 分鐘，所得的 DNA 沈澱物，經真空乾燥後，溶於適量的 1X TE 緩衝液中。

四、 *B. stearothermophilus* NCIB 8924 染色體 DNA 的抽取

菌體 DNA 之抽取是依據 Amemura 等人(1988)所敘述的方法進行。取 TS broth 過夜培養之 *B. stearothermophilus* NCIB 8924，培養液以 3000rpm 離心 10 分鐘，回收菌體稱其濕重，於每克之菌體加入 1X TE buffer 5ml，前述懸浮液加入 lysozyme 10mg (10mg/1g pellet)，混合均勻後，置於 30°C 水浴中反應 30 分鐘，每隔 5 分鐘輕搖一次(並以 10% SDS 抹片檢測其細胞融解情況)。隨後加入 0.5M EDTA 1.2ml，搖晃直到呈現黏稠狀後再加入 10%SDS 0.7ml，混合均勻後即置於 37°C 水浴中反應 1hr。接著，加入 phenol 6ml 並搖勻，再加入 chloroform 6ml，輕輕搖 5min 即以 3000rpm 離心 10 分鐘，使分成三層，小心地以 pipette 取最上面一層至新的離心管(因為具黏性，易吸到其他層之液體，須小心操作)。加入兩倍體積的 ethanol，使 DNA 沉澱並防止 DNA 被破壞，隨後將 DNA 以 pipette 撈出至新的離心管離心 3000rpm、10 分鐘，再將多餘水份吸乾(用 pipette)後倒放，使 DNA 乾燥，最後溶於適量的無菌水，並測 DNA 濃度(最好將其濃度調成 2ng/μl 的 DNA 溶液)。

五、 DNA 的洋菜膠體電泳分析

稱取適量的洋菜膠(agarose)，加熱溶解於電泳緩衝液 1x TAE (40mM Tris-acetate 及 1mM EDTA，以冰醋酸調整 pH 至 7.8)中，使洋菜膠濃度為

0.8~2.0% (w/v)，等洋菜膠溶液冷卻至 50~60°C 時，將之倒入鑄膠槽，並加上齒梳(well comb)。等洋菜膠冷卻凝固後，將洋菜膠放入水平式電泳槽裝置，浸於電泳緩衝液中。把欲分析的樣品與染劑(0.25% bromophenol blue、0.25% xylene cyanol 及 30% glycerol)以 5:1 的比例混合均勻，再小心注入洋菜膠體的小洞(well)中。接上電源，以電壓為 5V/cm 下進行電泳。分離完畢後，取出洋菜膠體以 ethidium bromide (EtBr, 5 µl/ml) 染色 10 分鐘後，以水略微清洗，復置於紫外燈下檢視染色帶的位置，並以 DNA 分子量標誌相比對，以判斷 DNA 分子的大小及濃度。

六、 DNA 片段的回收及純化

利用 PCR 合成的 DNA 片段或經內切限制酵素剪切得到的 DNA 小片段，利用 GENECLAN III kit (Bio 101 Inc., California, USA) 進行回收及純化。當 DNA 洋菜膠體電泳完成後，將含有欲回收 DNA 片段的洋菜膠體用刀片切下，在每支 1.5 ml 微量離心管內放入約 0.4g 的洋菜膠體，加入 3 倍體積的 6 M NaI 溶，於 55°C 加熱 5 分鐘使洋菜膠體完全溶解，待回復至室溫後，再加入 5ul 的 glassmilk，劇烈振盪，使成為懸浮狀。隨後置於冰浴中 5 分鐘，間每隔 1 分鐘振盪混合一次，使 glassmilk 保持懸浮狀。及應液於 12,000 rpm (KM-152000, KUBOTA Co., Tokyo, Japan) 離心 15 秒鐘，去掉上清液。再離心一次，以微量吸管將殘餘的液體吸除。加入 600 µl 冰冷的 New Wash 溶液(New Wash 濃縮液 14 ml 加入 280 ml 的二次去離子水及 310 ml 之 100% ethanol，混合稀釋而成)，振盪混和均勻，於 12,000 rpm 離心

30 秒鐘，去掉上清液，並重複上述清洗步驟 3 次。再離心一次，以微量吸管吸除殘餘的液體，加入 20 μ l 的 1X TE 緩衝液，使清洗好的沈澱物懸浮 12,000 rpm 離心 30 秒鐘。小心吸取上清液，並置放在另一支新的微量離心管中，此即為所要的 DNA 片段。

七、 聚合酶鏈鎖反應

聚合酶鏈鎖反應是一種以酵素方法來增殖 DNA 的技術，依據 Cadwell 和 Joyce (1992) 所發表的方法，設計兩個與所要增殖 DNA 序列兩端的寡核苷酸引子，其(G+C) % 接近 50%，再以想要增殖的目標 DNA 做為模板(template)，和 dNTP 及適當的緩衝液混合，經過變性(denature)，煉合(annealing)及 *Taq* DNA polymerase 的延伸(extension)作用，將此段 DNA 複製出來。重複此項循環，而使目標 DNA 達到增殖的目的。

濃度為 100 mM 的 dATP、dGTP、dCTP 及 dTTP (NEB 公司)，各取 25 μ l，注入一支 1.5 ml 微量離心管中，加入 900 μ l 二次蒸餾水，得到四種鹽基濃度各為 2.5 mM 的 dNTP 混合液。取一支 0.5 ml 微量離心管，依序加入適量之二次去離子水，10 μ l 緩衝液(10X)，8 μ l dNTP 混合液(各種 dNTP 濃度皆為 10 mM)。引子 10 pmol 及模板(如為已經純化之目標 DNA 則需 1 ng，如為染色體 DNA 則需 0.05-1.0 μ g 才能將單套基因加以增殖)，再加入 1 unit Deep Vent DNA polymerase (2 units/ μ l，NEB 公司)一共 100 μ l，混合均勻後，離心使反應液集中至管底。將此微量離心管放入 Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT., USA) 的反應槽內，設定 PCR

的反應條件：94°C，3 分鐘，使 DNA 變性；60°C，1 分鐘，使模板與引子煉合，再於 73°C 使 DNA 延伸 1 分鐘；在此條件下重複 35 個循環(cycle)後，再於 72°C 反應 10 分鐘，使 DNA 延伸完全。此反應條件可依引子之結構不同而改變。隨後保持 4°C。反應完成後，以洋菜膠體電泳分析 PCR 產物，確定 DNA 合乎預期的大小後，以 GENECLAEN III kit 回收。

八、 DNA 黏接反應

在總體積為 30 μ l 的反應液中，含有 2 μ l T4 DNA ligase (3 units/ μ l，Promega 公司)，3 μ l 10X reaction buffer 【含 500mM Tris-HCl (pH 7.8)，100mM MgCl₂，100mM DTT 及 1mM ATP】與 insert DNA 及 vector(insert 與 vector DNA 的莫耳數比約為 5：1)，最後以去離子水補至 30 μ l。將混合液置於 16°C 反應 8~14 小時，使 DNA 互相黏合。

九、 表現載體之構築

利用兩組引子(正向引子：--^{5'}GAGGATCCGTTGGGAGAAGGAA^{3'}--；反向引子：--^{5'}ACTGCAGTTCGAATGCCAGTTG^{3'}--)與 pQE32 來構築表現 *B. stearothermophilus* NCIB 8924 胺基切割 II 之表現載體。聚合酶素連鎖反應複製 DNA 片段所使用之設備為 GeneAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA), 每 100 μ l 反應混合物中包含 8 μ l 引子、4 μ l DNA 模板、2 μ l dNTPs、10 μ l Supertherm polymerase 10x buffer、1 μ l Supertherm polymerase 及 158 μ l d.H₂O。每一循環為：DNA 在 96°C 下

變性 2 分鐘、在 52°C 下黏合 1.5 分鐘及在 72°C 下聚合 1.5 分鐘，而反應總共進行 30 個循環。PCR 產物則先跑 1% 膠體電泳，再以 GeneClean III 套組(Bio 101 Inc., LaJolla, CA, USA)進行 1.2 kb DNA 片段回收，所回收片段經 *Bam*HI 與 *Pst*I 剪切後再選殖到 pQE32 以生產 pQE-LAPII 系列表現載體，此類型載體造成 胺基分解 之 C 端與 6 個組織胺酸形成融合蛋白質，且此融合基因之表現受噬菌體 T5 起動子控制。

十、 酵素純化

Immobilized-metal affinity chromatography (IMAG)之原理為利用具 His₆- tagged 之重組蛋白質與固定於管柱樹脂之金屬離子產生配位鍵結，使欲純化之蛋白質留滯於管柱內，而非專一性物質則由清洗緩衝液去除，最後再以溶析液將目標蛋白質沖離(Hochuli *et al.*, 1988)。本研究所欲純化之野生型及突變型酵素，其操作程序則依提供廠商(Novagen Inc., WI, USA)指示進行。首先取 2.5 ml 之 His-bind 樹脂均勻注入管柱中並以 3 倍體積蒸餾水清洗兩次，隨後加入 5 倍體積電荷緩衝液(50 mM NiSO₄)，此時樹脂呈藍綠色，接著以 3 倍體積的結合緩衝液(5 mM imidazole, 0.5 M NaCl 及 20 mM Tris-HCl; pH 7.9)平衡樹脂。待結合緩衝液流到管柱底部，以製備好發酵液慢慢注入管柱中並以 10 倍結合緩衝液做初步沖洗，接著再以 6 倍體積沖洗緩衝液(60 mM imidazole, 0.5 M NaCl 及 20 mM Tris-HCl; pH 7.9)沖洗，最後利用溶析緩衝液(1 M imidazole, 0.5 M NaCl 及 20 mM Tris-HCl; pH

7.9) 將結合於樹脂之酵素沖離出來。所得純化酵素為重組 *B. stearotheophilus* 白胺酸 胺基切割 II，簡稱為 rLAPII。

十一、蛋白質電泳分析

蛋白質電泳分析是根據 Lacks and Springhorn (1980) 提出的 SDS-PAGE 方法進行，而跑蛋白質電泳所使用設備為 Mini-Protein II Dual Slab Cell (Bio-Rad Laboratories, Beverly, MA, USA)。製備好的 12% polyacrylamide 解析凝膠(resolution gel) (二次去離子水 3.3 ml，30% acrylamide mixture 4 ml，1.5 M pH 8.8 的 Tris-HCl 2.5 ml，10% SDS 100 μ l，10% ammonium persulfate 100 μ l，TEMED 4 μ l) 緩緩注入預先組架完成的電泳玻璃中，並預留距離頂端約 1.5 cm 的空間，之後加入少量的二次去離子水，使凝膠保持水平狀態。待凝膠凝固後，傾斜吸出水分，再將配置好的 5% polyacrylamide 聚焦凝膠(stackig gel) (二次去離子水 1.4 ml，30% acrylamide mixture 330 μ l，1.0 M pH 6.8 的 Tris-HCl 250 μ l，10% SDS 20 μ l，10% ammonium persulfate 20 μ l，TEMED 2 μ l) 注入已配置好的解析凝膠電泳玻璃中。接著插入齒模(comb)，待凝膠凝固後取出齒模。將預分析之蛋白質與等體積的 2 倍注入色劑緩衝液(loading dye buffer) 經震盪混合，置於沸水中煮 10 分鐘後，立即放於冰上最少 1 分鐘。短暫離心後，取適量注入凝膠中。最初以 70V 的電壓使蛋白質能在聚焦凝膠內聚集，直到染劑移動到解析凝膠與聚焦凝膠的交界線，再改為 100V 的電壓繼續分離蛋白質，直到染劑完全離開凝膠為止。取下凝膠，以 Coomassie Brilliant Blue R-250 [0.125% Coomassie blue R-250，50% methanol (v/v)，10% glacial acetic acid (v/v)] 染

色約 10 分鐘後，以二段式去染法，將背景藍色褪去。先將染色完畢之膠體改置於去染液 I [50% methanol (v/v), 10% glacial acetic acid (v/v)]，緩慢搖動 20 分鐘，再將膠體轉入去染液 II [7% methanol (v/v), 5% glacial acetic acid (v/v)]，輕輕搖晃，直到膠體背景完全褪去。取出浸泡於二次去離子水中約 2-3 分鐘，最後以玻璃紙密封風乾保存。

十二、呈色法測定酵素活性

1. 酵素活性之測定

APII 能分解 N 端具疏水性胺基酸之胜，因此可用 N 端為 leucine 之化合物 leucine-*p*-nitroanilide 做為基質進行反應，leucine-*p*-nitroanilide 經酵素反應後，可產生 leucine 及 nitroanilide。Nitroanilide 分子量 138.1，為一環狀分子，呈色為黃色，可在 OD₄₀₅ 測量吸光值。一個酵素活性單位 (1U) 乃表示於 55°C，每分鐘可產生 1μmole 的 nitroanilide 所需之酵素量，標準曲線可由不同濃度之 nitroanilide 經呈色法分析得之。

2. LAP 之活性染色

活性染色法可偵測蛋白質是否具有 LAP 活性及 LAP 的分子量 (Manchenko, 1994)。將蛋白質以 Native PAGE(不含 SDS)分離後，將膠體置於活性染色液[100 mM sodium phosphate buffer (pH 5.8), 1 mM CoCl₂, 20 mM L-leucyl-2-naphthylamide, 30 mg Fast Black K, 以 Millipore HA, 0.45 μM 過濾]中，在 37°C 無光的情況下反應，直到深紫色的 bands 出現。以二次去

離子水略為清洗後，以 7%醋酸固定顏色。最後以玻璃紙密封，風乾保存。

十三、 rLAPII 性質之分析

1. rLAPII 最適反應溫度

取 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液 930 μ l，加入 100 mM leucine-*p*-nitroanilide 40 μ l，各於 30~100°C 靜置 10 分鐘後，加入 rLAPII 酵素液 20 μ l，於不同溫度下(30~100°C)中反應 10 分鐘，最後加入 100%之 acetic acid 100 μ l 終止反應，測量 OD₄₀₅ 之吸光值。

2. pH 值對 rLAPII 活性的影響

分別取 20 mM citrate-phosphate (pH 3.0-7.0)； 20 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (pH 6.0-8.0)； 20 mM Tris-HCl (pH 7.1-9.0) 及 20 mM glycine-NaOH (8.6-10.6)等 930 μ l，加入 100 mM leucine- *p*-nitroanilide 基質 40 μ l，於 55°C 下靜置 10 分鐘後，加入 rLAPII 酵素液 20 μ l，於 55°C 中反應 10 分鐘，最後加入 100%之 acetic acid 100 μ l 終止反應，測量 OD₄₀₅ 之吸光值。

3. 金屬離子與化學試劑對 rLAPII 活性的影響

取 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 930 μ l，加入 100 mM 之不同金屬離子與化學試劑 10 μ l 及 100 mM leucini-*p*-nitroanilide 40 μ l，於 55°C 下靜置 10 分鐘後，加入 rLAPII 酵素液 20 μ l，於 55°C 中反應 10 分鐘，最後加入 100%之 acetic acid 100 μ l 終止反應，測量 OD₄₀₅ 之吸光值。

4. rLAPII 對基質的選擇性

取 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 880 μ l，加入 10 mM 之不同基質 100 μ l，於 55°C 下靜置 10 分鐘後，加入 rLAPII 酵素液 20 μ l，於 55°C 中反應 10 分鐘，最後加入 100%之 acetic acid 100 μ l 終止反應，測量 OD₄₀₅ 之吸光值。

十四、定點突變法

使用購自 Stratagene 公司的 QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit，並依照其只是進行選位突變，其操作流程如附圖六。

1. 檢測勝任細胞的存活

小心將 XL1-Blue Supercompetent Cells 於 -80°C 冰箱中取出放在冰中，取 50 μ l XL1-Blue Supercompetent Cells 於 eppendorf tube 中。接著加入 1 μ l 經過 *Dpn* I 處理過的樣品，於 42°C 下 heat pulse 45 秒後立即放入冰浴中 2 分鐘。再加入事先於 42°C 預熱的 NZY 培養基後，於 37°C 恆溫培養箱中培養，以 230 rpm 震盪培養 1 小時，最後將 250 μ l 的樣品均勻塗抹在含有 ampicillin 之 LB 平板培養機上，於 37°C 恆溫培養箱中培養至少 16 小時。以其菌落生長情形檢測勝任細胞的存活狀況。

2. 突變 DNA 之製備

合成與目標雙股 DNA 互補且含定點突變的引子(大約 25-45 mers 的正反向引子)，引子必須經由 OPC 純化，如此可避免突變率的降低。以 *pQE-AP*

II 為模板進行 PCR 反應，其反應物製備為加入 5 μ l 的 10x reaction buffer、4 μ l (約 10 ng) *pQE-LAPII* 模板、125 ng 的正反向引子及 1 μ l dNTP (含 dATP、dCTP、dGTP 及 dtTP)，再以無菌水補至 50 μ l 的總體積。

最後於反應前加入 1 μ l *pfu* Turbo DNA polymerase (2.5 U/ μ l)。而 PCR 條件為：95 $^{\circ}$ C、30 秒，使 DNA 變性(denature)；55 $^{\circ}$ C、1 分鐘，使模板和引子黏合(anneal)；再於 68 $^{\circ}$ C 使 DNA 延伸 2 分鐘(extension)，反應進行 16 個循環後，再以 68 $^{\circ}$ C、30 分鐘使 DNA 延伸完全，待所有循環完成後置於冰水中數分鐘，使溫度降至 37 $^{\circ}$ C 以下。最後加入 1 μ l 的 *Dpn* I 到反應試管中，以微量吸管上下小心的吸放使酵素與樣品均勻混合，再置於 37 $^{\circ}$ C 反應 1 小時，以去除未突變之甲基化雙股 DNA 模板。

3. 轉形到 XL1-Blue supercompetent cells

突變之雙股 DNA 製備好後，即可轉型入勝任細胞中。其方式為在 50 μ l XL1-Blue supercompetent cells 中加入 1 μ l 已用 *Dpn* I 處理過的樣品，於 42 $^{\circ}$ C heat pulse 45 秒後立即放入冰浴中 2 分鐘。再加入事先於 42 $^{\circ}$ C 預熱的 NZY 培養基後，於 37 $^{\circ}$ C 恆溫培養箱中培養，以 230 rpm 震盪培養 1 小時，最後將 250 μ l 的樣品均勻塗抹在含有 ampicillin 之 LB 平板培養機上，於 37 $^{\circ}$ C 恆溫培養箱中培養至少 16 小時。挑出單一菌落，抽取 DNA 定序，以挑選出突變之 DNA。

十五、 酵素之氧化穩定性及對過氧化氫之抗性

酵素之氧化穩定性測試係將純化後之 rLAPII 分別在 4 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C 及 55 $^{\circ}$ C

等不同溫度下，靜置於新鮮配製好的 H_2O_2 和 50 mM Tris-HCl 緩衝液中 30 分鐘，所測得的活性以未處理的酵素活性為 100% 換算其殘餘活性之百分比。酵素對過氧化氫之抗性分析則是將 25 μg 的純化酵素在 55 $^\circ\text{C}$ 的溫度下，分別於 50 mM、100 mM 和 300 mM H_2O_2 靜置 30 分鐘，再進行 SDS 膠體電泳及未經 SDS 處理之 native 膠體分析。

十六、 氧化酵素次級結構之拉曼光譜儀分析

先將純化酵素靜置於 50 mM 和 300 mM H_2O_2 30 分鐘後，連同未經 H_2O_2 處理的純化酵素進行冷凍乾燥，所得酵素粉末再置入 Bruker RFS-100 FT-spectrophotometer (Bruker Optik GmbH, Lubeck, Germany) 儀器中，偵測 Raman shift 從 0 到 3500 cm^{-1} 之酵素結構分析。

十七、 鈷離子親合性

為了解野生型酵素以及突變型酵素與鈷離子的親合性，將純化所得之酵素(約 25 μg)在進行活性測試時，分別添加 0、1、5、10、50、 10^2 、 5×10^2 、 10^3 、 5×10^3 和 10^4 μM 的 Co^{2+} 離子，由各酵素出現最高比活性時所添加 Co^{2+} 離子的濃度來判斷該酵素之鈷離子親合性高低。

十八、 EDTA 處理之酵素再活化作用

報導指出，將金屬酵素先以金屬螯合劑(如 EDTA 或 phenylmethanesulfonyl fluoride)處理所得的 apo-enzyme，於添加其所需的金屬離子後，酵素活性明顯恢復(Lin *et al.*, 1997)。本研究為比較 Asp 與 His 突

變酵素的活性恢復反應與野生型酵素之差異，分別將野生型酵素與突變酵素以 EDTA 處理 3 小時，再進行每八小時更換一次 Tris-HCl 緩衝液共二十四小時的透析。透析後的酵素添加不同濃度的 Co^{2+} 離子，分析其活性恢復反應。

十九、 酵素動力學分析

進行酵素動力學分析時，採用 Michaelis-Menten equation 及 Lineweaver-Burk equation。由 Michaelis-Menten equation 的圖形中可知，在實驗進行上，若 S 接近飽和時，其 V_i 接近 V_{max} ，與真實的 V_i 無線性關係，所以比較正確的做法是：先選擇 3 至 4 種基質濃度(相互之間成一定比例)測定 V_i 值以低基質濃度所得的 V_i 值為分母尋找使 V_i 提高的值介於 1.3~1.7 倍之間的基質濃度範圍後，由此範圍中選擇 5 至 6 種基質濃度，進行分析。以及在最高抑制劑濃度之圍內，選定 3~5 種抑制濃度，分別測定酵素活性受抑制劑影響之變化。反應時所使用的酵素濃度必須稀釋到反應後所測之產物 OD 值介於 0.1 至 0.6 之間。基質濃度則以一般分析酵素活性時所使用的濃度為飽和濃度再加以稀釋。利用此範圍的基質濃度所獲得的 V_i 值進行酵素動力學分析，可得到比較正確的 K_m 及 V_{max} 。一般而言，基質濃度應該介於 $0.33 \sim 2.0 K_m$ 之間，在此區域內，當 S 固定，酵素的濃度與 V 成正比。例如：當基質的濃度為 S_1 時，若添加的酵素量為 X，其反應速率為 V_x ；當添加的酵素量為 $1/2 X$ 時，其反應速率為 $1/2 V_x$ ，則我們稱 S_1 時之 V 為 V_x 。因此，在不同基質濃度可得到相對的 V 值。但是：

1. 當基質濃度提高 2 倍時，如果 V 也提高 2 倍，則表示所選擇的基質濃度太低，造成 V 太接近 V_0 。
2. 當基質濃度提高 2 倍時，如果 V 不變，則表示所選擇的基質濃度接近

飽和，造成 V 太接近 V_{\max} 。

3. 當基質濃度提高 2 倍時，如果 V 提高為 1.3 ~ 1.7 倍，此時選擇的基質濃度是較適當的，而所得到的 V 也較為正確。

由此方法所得到的 V 值(至少 5 個值)，加以分析即可求得酵素之各項動力學參數。

結 果

一、重組 *B. stearothermophilus* LAP II 的大量表現及純化

1. *B. stearothermophilus* 白胺酸 胺基切割 II 的選殖

根據 Motoshima 等人(1997) 的研究可知 *B. stearothermophilus* NCIB 8924 LAP II 的基因序列如附圖九所示。此基因有 1,241 個鹼基對，所表現的酵素含有 413 個胺基酸。在分離出此菌的染色體 DNA 後，針對此基因設計出正、反向引子(見材料方法)，進行 PCR 反應以正確選殖出 *lap II* 基因。圖一顯示 PCR 反應後的 DNA 產物為 1.2 kb。

2. IPTG 誘導之最適濃度與時間

將上述 PCR 產物(*lap II*)與質體 pQE-32 進行 DNA 黏接而構築成一重組質體，我們稱此重組質體為 pQE-LAPII。接著轉形入 *E. coli* M15 細胞內，分別以最終濃度為 0.01 mM、0.05 mM、0.1 mM、0.5 mM、1 mM 和 10 mM 的 IPTG 和不同培養時間(20°C、28°C 及 37°C)進行誘導。圖二顯示以 0.1 mM 的 IPTG 在 28 °C 下進行誘導的效果最好。此外，圖三顯示此重組 *B. stearothermophilus* LAP II (rLAPII)在 0.1 mM 的 IPTG 及 28 °C 下誘導六小時，即可表現出最大量的蛋白質。

3. 酵素之純化

以最適誘導條件進行酵素大量表現後，隨即利用 Ni-NTA 樹脂純化酵素。純化後所收集的 rLAPII 蛋白質的分子大小為 44.5 kDa (圖四)，表一顯示與粗萃取液相比，酵素純化效率達 9.2 倍，酵素之比活性為 425 U/mg。

二、重組 *B. stearothermophilus* LAP II 的特性分析

1. pH 值及溫度對酵素活性之影響

以 Leu- ρ -nitroanilide 為受質，於不同的 pH 值測定酵素之活性，所得數據以最高活性為 100%，其他則換算成相對活性。圖五結果顯示 pH 8.0 Tris-HCl 為 rLAPII 之最適操作 pH 值及緩衝液。

在 pH 8.0 之 50 mM Tris-HCl 緩衝溶液中，測 rLAPII 在不同溫度下之相對活性，結果顯示，酵素反應之最適溫度為 60°C(圖六)，70°C 時仍有將近 75% 的相對活性。酵素在 60°C 以下 30 分鐘仍有相當高的穩定性，即使在 65°C 時仍有 83% 的相對活性。

2. 酵素對基質的選擇性

Aminopeptidase 可以特異性的辨認 N 端胺基酸或是人工合成的基質如：L-aminoacyl-2-naphthylamide (AA-NA)與 L-aminoacyl- ρ -nitroanilide (AA-Nan)，並將其鍵水解。因此，為了瞭解 rLAPII 酵素對於不同基質的催化能力，分別以 Leu、Lys、Arg、Glu、Pro、Ala、Val、Phe-Ala 及 Ala-Ala-Pro-Leu 之 L-aminoacyl- ρ -nitroanilide 為反應基質。將 L-aminoacyl- ρ -nitroanilide 溶於 rLAPII 的緩衝液中，並使其最終濃度為 1 mM。置於 55°C 恆溫槽中預熱 10 分鐘。隨後加入酵素，於 55°C 下反應 10 分鐘，再加入最終濃度 10% 的 acetic acid 停止反應，並比較酵素的相對活性和比活性(表二)。結果發現，酵素對 Leu- ρ -nitroanilide 具有最高的活性，而對於 Pro、

Glu、Val、Phe-Ala 和 Ala-Ala-Pro-Leu 之 L-aminoacyl- ρ -nitroanilide 的活性都相當低。

3. 金屬離子與化學試劑對酵素活性之影響

將各種不同的金屬離子以 1 mM 的濃度，個別加入 rLAPII 酵素溶液中，測試酵素活性。結果如表三所示， Co^{2+} 對酵素活性具有增強效應；而 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 和 DTT、EDTA 等金屬螯合劑則對其具有強烈的抑制作用。此外，經 EDTA 處理後的失活酵素可由 Co^{2+} 刺激而恢復活性。

三、 酵素中甲硫胺酸(methionine)殘基經定點突變後對過氧化氫之抗性

1. 過氧化氫對 rLAPII 之影響

為了要瞭解 rLAPII 對過氧化氫所引起的氧化作用之抗性本研究將酵素以不同濃度之 H_2O_2 (0 mM、25 mM、50 mM、100 mM、200 mM、300 mM 和 400 mM) 處理，並分別放置於 4°C 、 30°C 及 55°C 等不同溫度 30 分鐘後測試酵素活性。結果發現，酵素在 4°C 時最不受 H_2O_2 之影響；然而在 55°C 且 H_2O_2 濃度達 200 mM 時，酵素則已完全失去活性(圖七)。

此外，將 25 μg 的酵素在 55°C 下，分別於 50 mM、100 mM 及 300 mM 之 H_2O_2 靜置 30 分鐘後，進行蛋白質電泳分析。結果如圖八 A 所示，隨著 H_2O_2 的濃度增加，蛋白質在電泳膠體上呈現的色帶也漸不明顯。又以未經去活性處理的酵素作電泳分析，則可發現 H_2O_2 會破壞酵素的雙體結構(homodimer) (見圖八 B)。

利用拉曼光譜儀分析酵素二級結構受 H_2O_2 之影響，結果如圖九所示。由光譜上 760 cm^{-1} 、 $830/850\text{ cm}^{-1}$ 和 700 cm^{-1} 強度的改變可知， H_2O_2 對酵素之 tryptophan、tyrosine 及 methionine 等三種胺基酸具有修飾作用。此外，以 $300\text{ mM H}_2\text{O}_2$ 處理的酵素內形成許多 α -helix 結構。

2. 突變基因之表現與酵素純化

我們利用定點突變技術以 Leu 取代酵素一級結構上的 Met 殘基，由設計其所需的引子(表四)進行突變。經由基因定序並與原來序列比對(圖十)，確認五個 rLAPII 上之 5 個 methionine 均被改變成 leucine。接著，將變異之重組質體轉形至 *E. coli* M15 內並以 IPTG 誘導以進行表現。純化後的變異蛋白質作電泳分析如圖十一所示，所有的變異酵素之分子量與野生型酵素相近，均為 45 kDa 。

3. 酵素之氧化穩定性

為評估野生型與甲硫胺酸突變型酵素對氧化失活之抗性，將這些酵素放置於含 H_2O_2 之 50 mM Tris-HCl 緩衝溶液(pH 8.0)中，在不同時間點取出測試酵素活性。如圖十二所示，在 H_2O_2 處理 5 分鐘後，野生型酵素仍可保有穩定之活性，而 Met82Leu 之酵素活性則已喪失 95%。此外，Met136Leu、Met254Leu 和 Met382Leu 等突變酵素之活性也明顯受到 H_2O_2 的影響而下降。

4. 酵素比活性與動力學特性

由表五的結果可知，rLAPII 中除了 Met-136 位置經突變後其比活性有明顯下降外，其他突變酵素之比活性與野生型很相近。動力學參數顯示，Met136Leu 的 k_{cat} 值減少了 47%，因此催化效率(k_{cat}/K_m)也降低了 50%。

四、 探討天門冬酸(aspartic acid)殘基在酵素之催化作用中扮演的角色

1. 突變基因之表現與酵素純化

由於 rLAPII 為金屬 胺基切割 中 M29 家族的成員之一，其與金屬結合的胺基酸殘基至今仍不清楚。為了想進一步探討此酵素之 Co^{2+} 結合部位，經比對了 M29 家族 胺基切割 的胺基酸序列(圖十三)後，在 rLAPII 中挑出 Asp-61、Asp-180、Asp-308、Asp-339、Asp-380、Asp-391 和 Asp-396 等殘基進行定點突變，此七個 Asp 殘基將被置換為 Ala。在確認七個 aspartic acid 均被置換成 alanine (見圖十四)後，隨即進行 IPTG 誘導和蛋白質大量表現。純化的變異酵素作蛋白質電泳分析如圖十五 A 所示，所有變異酵素之分子量與野生型酵素相近，均為 45 kDa。活性染色結果如圖十五 B 所示，Asp391Ala、Asp396Ala 與野生型酵素的呈色度非常接近，Asp180Ala 與 Asp339Ala 明顯減弱，Asp61Ala、Asp308Ala 與 Asp380Ala 則不見紫色色帶。

2. 酵素比活性與動力學特性

野生型與天門冬酸突變酵素比活性之比較結果如表六所示，Asp-380 位置經突變後已喪失酵素活性，Asp61Ala 與 Asp308Ala 兩突變酵素的比活

性明顯下降，而 Asp391Ala 和 Asp396Ala 則具有較高的比活性。動力學參數顯示，Asp61Ala 與 Asp308Ala 兩突變酵素的 k_{cat} 值降低 60% 之多。此外，Asp61Ala 之催化效率(k_{cat}/K_m)降低達 83% 之多，Asp308Ala 和 Asp339Ala 也降低了 70% 。

3. Asp 變異酵素之鈷離子親合性

由表七結果可知，Asp380Ala 變異酵素的比活性在 Co^{2+} 離子濃度逐漸升高的添加過程中，仍無法測得。Asp61Ala 變異酵素在添加 Co^{2+} 離子濃度小於 5000 μM 時，比活性都非常低，直至添加濃度達 5000 μM 時才出現 26.7 U/mg 的最高比活性。

4. EDTA 處理後 Asp 變異酵素之再活化反應

經 EDTA 處理後之酵素稱為 apo-enzyme，其活性會完全喪失；然而在添加其所依賴的金屬離子後，便可恢復酵素活性，此乃金屬酵素的重要特性。圖十六顯示 EDTA 處理後之 Asp 變異酵素在添加 10 μM $CoCl_2$ 後所測得之酵素比活性結果，Asp308Ala 變異酵素之活性完全不能恢復；Asp61Ala 變異酵素之活性恢復情形則不明顯。

五、 探討組織胺酸(histidine)殘基在酵素之催化作用中扮演的角色

1. 突變基因之表現與酵素純化

將 His-191、His-227、His-345 和 His-378 等殘基置換成 Leucine。突變基因定序結果如圖十七所示，經確認後隨即進行 IPTG 誘導和蛋白質大量

表現。純化的變異酵素作蛋白質電泳分析如圖十八 A 所示，所有變異酵素之分子量與野生型酵素相近。圖十八 B 顯示活性染色之結果，His345Leu 和 His378Leu 兩變異酵素不具活性，His191Leu 及 His227Leu 的呈色度則稍微減弱。

2. 酵素比活性與動力學特性

野生型與組織胺酸變異酵素之比活性結果如表八所示，His345Leu 和 His378Leu 兩者無法測得酵素活性。His227Leu 的催化效率(k_{cat}/K_m)比野生型酵素降低約 40%，His191Leu 的催化效率則比野生型增加。

3. His 變異酵素之鈷離子親合性

由表九結果可知，His345Leu 和 His378Leu 兩變異酵素的比活性在 Co^{2+} 離子濃度逐漸升高的添加過程中，亦無法測得；而 His191Leu 和 His227Leu 兩者與野生型酵素在添加 5 μM 的 Co^{2+} 離子濃度時即出現高於 29 U/mg 的比活性。

4. EDTA 處理後 His 變異酵素之再活化作用

圖十九顯示 EDTA 處理之野生型與組織胺酸變異酵素活性的比較結果，我們發現 His345Leu 和 His378Leu 兩者如同 Asp308Ala 突變酵素一樣，在添加 10 μM CoCl_2 後仍無法恢復酵素活性。

六、 天門冬酸與組織胺酸殘基第二次突變之分析

1. 變異酵素之鈷離子親合性

為了進一步探討 rLAPII 的 Asp-61、Asp-380、His-345 和 His-378 等殘基在酵素功能上所扮演的角色。本研究將 Asp-61 和 Asp-380 兩殘基置換為同樣具有羧基支鏈的醯胺天門冬酸(glutamic acid)，此外，也將 His-345 和 His-378 兩殘基置換為和組織胺酸一樣帶正電荷支鏈的精胺酸(arginine)。經定序結果(圖二十)確認突變無誤後，隨即進行酵素大量表現、純化和酵素之鈷離子親合性與 apo-enzyme 再活化等分析。

表十結果顯示，Asp61Glu 變異酵素在添加 Co^{2+} 離子濃度為 $10\ \mu\text{M}$ 時，比活性為 $29.2\ \text{U}/\text{mg}$ 與野生型酵素相當接近。然而，Asp380Glu、His345Arg 和 His378Arg 三者 Co^{2+} 離子濃度逐漸升高的添加過程中，仍無法測得酵素活性。

2. EDTA 處理後變異酵素之再活化作用

圖二十一為 Asp61Glu、Asp380Glu、His345Arg 以及 His378Arg 等變異酵素以 EDTA 處理後的再活化反應，結果顯示 apo-Asp61Glu 在添加 $10\ \mu\text{M}\ \text{Co}^{2+}$ 離子時，酵素活性明顯恢復；apo-Asp380Glu 活性略為恢復。Apo-His345Arg 和 apo-His378Arg 在添加 $10\ \mu\text{M}\ \text{Co}^{2+}$ 離子的條件下仍無法表現酵素活性。

討 論

一、 重組 *B. stearrowthermophilus* LAP II 酵素純化與特性分析

1. 基因表現與酵素純化

在完成 *lap II* 基因選殖後，定序結果發現在第 449、1167 和 1301 三個鹼基對與 1997 年 Motoshima 等人所發表的基因序列有所不同，其改變分別為 TTC→GTC、CAA→CGA 和 AAC →GAC。因此，胺基酸殘基則為 Phe57、Gln296 及 Asn341 三者分別變成 Val、Arg 及 Asp。

重組質體 pQE-LAPII 轉形入 *E. coli* M15 細胞後，在測試 IPTG 誘導之最佳條件結果顯示，以 0.1 mM IPTG 於 28°C 誘導 6 小時的效果最好，所得到的重組酵素佔可溶性總蛋白的 12%。純化後的重組酵素經蛋白質電泳分析得知，其分子量(M_r)與野生型酵素相同，為 44.5 kDa。經純化可得到比活性 42.5 U/mg 的重組酵素，顯示利用單一步驟分離的純化技術具有 9.2 倍之純化率。

2. 重組酵素的生化特性

rLAPII 活性表現的最適 pH 值為 pH 8.0 的 Tris-HCl 緩衝溶液，而最適溫度為 60°C。酵素在 65°C 時仍保有 80% 活性，但當溫度達 80°C 時酵素活性則完全喪失。在 ρ -nitroanilide 衍生物中，此重組酵素對 Leu- ρ -nitroanilide 的分解作用最好，可達 100%；其他依序為 Arg- ρ -nitroanilide (46.3%)、Lys- ρ -nitroanilide (37.8%) 以及 Ala- ρ -nitroanilide (15.2%)；而對於 Glu- ρ -nitroanilide、

Phe-Ala- ρ -nitroanilide 和 Ala-Ala-Pro-Leu- ρ -nitroanilide 等較不具有分解能力。

3. 化學試劑對酵素活性之影響

由表三結果顯示， Hg^{2+} 離子會完全抑制酵素活性，Ramachandrin 和 Witkop 兩人(1964)的研究指出，此結果表示含有 indole 官能基之胺基酸(例如：tryptophan)在酵素功能上扮演重要的角色。 Zn^{2+} 離子會造成酵素 89.4% 的活性喪失，而 Magboul 和 McSweeney 兩人 (1999) 在 *Lactobacillus curvatus* DPC2024 的 LAP 研究上也發現有相同的結果。其他如 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Mn^{2+} 等離子對酵素活性則有明顯的抑制作用。與其他受 Co^{2+} 離子活化的金屬酵素(Magboul and McSweeney, 1999；Montel *et al.*, 1995)一樣， Co^{2+} 離子可以刺激 rLAPII 的催化活性。

金屬胜肽胺基切割酶對金屬離子不同的選擇性，例如：*Streptomyces griseus* (Maras *et al.*, 1996)與 *Aeromonas proteolytica* (Chevrier *et al.*, 1994)的 LAPs 為 Zn-依賴型。經 EDTA 處理而失活的 rLAPII 在添加 1 mM 的 CoCl_2 後，酵素活性明顯恢復，添加其他氯化物溶液則無此反應。此項結果顯示， Co^{2+} 離子為 rLAPII 活性表現的重要輔助因子。類似情形也出現在 *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* S93 的 AP (Arora and Lee, 1994) 和 *B. stearothermophilus* 的原生型 LAP II 特性上 (Myrin and Hofsten, 1974)。以上結果顯示，rLAPII 的生化特性與原生型 LAP II 十分相似。

二、酵素中 Met 殘基經定點突變後對過氧化氫之抗性

1. H₂O₂ 對 rLAPII 之影響

根據圖七結果顯示，酵素在 4°C 時最不受 H₂O₂ 之影響；在 30°C、300 mM H₂O₂ 存在的情形下，酵素活性減少了 50%；然而在 55°C 且 H₂O₂ 濃度達 200 mM 時，酵素則完全失去活性。值得一提的是，rLAPII 在 4°C 及 0.5 mM H₂O₂ 存在下，活性可以維持一小時。事實上，大多數蛋白質對於氧化作用引起的傷害是非常敏感的，僅少數例外，例如：*Bacillus* sp. KSM-K38 的 α -amylase 在 1.8 M H₂O₂ 存在下仍保有很好的酵素活性 (Hagihara *et al.*, 2001)，以及 *Bacillus amyloliquefaciens* 的變異 subtilisin (Estell *et al.*, 1985) 對 1 M H₂O₂ 具有抗性。這樣的特性使前述兩酵素在工業上有很大的應用潛力。

2. 酵素純化與動力學分析

圖十一顯示，所有的 Met 變異酵素之分子量為 45 kDa，與野生酵素相同 (Kuo *et al.*, 2003)。活性染色顯示變異酵素還保有 LAP 活性；野生酵素、Met82Leu、Met88Leu、Met136Leu、Met254Leu 與 Met382Leu 的比活性分別為 133.4、132.6、131.1、90.9、116.7 和 108.5 (U/mg)，此兩項結果相當一致。動力學參數顯示，Met136Leu 的 k_{cat} 值減少 47%，因此催化效率 (k_{cat}/K_m) 也降低了 50%。由此可知，Met-136 在 *Bacillus stearothermophilus* LAP II 對抗氧化上扮演重要的角色。Kachurin 的研究 (1995) 也指出酵素中只有一個 Met 殘基在酵素的催化過程中具有影響。

3. 酵素之氧化穩定性

圖十二顯示，Met136Leu 變異酵素之活性受到 H_2O_2 的影響最明顯。胺基酸支鏈因 H_2O_2 影響所引起的改變，是造成酵素在氧化過程中喪失活性的主要原因。雖然，仍需更多證據才能確定 Met 殘基在蛋白質構造上真正扮演的角色，不過根據 Levine 等人(2000)的研究指出，Met 殘基可參與細胞代謝的調節及執行抗氧化功能。此外，在策略運用上，可將置換為 H_2O_2 對具有抗性的其他胺基酸，藉以提高酵素的抗氧化性，*Agrobacterium radiobacter* 的 *N*-carbamoyl D-amino acid amidohydrolase (Chien *et al.*, 2002) 就是一例。

三、天門冬酸(Aspartic acid)殘基在酵素之催化作用中扮演的角色

1. 酵素純化與動力學分析

在評估野生型與天門冬酸突變酵素之比活性，表六結果發現，Asp380Ala 喪失酵素活性，而 Asp391Ala 和 Asp396Ala 則具有較高的比活性。動力學參數顯示，Asp61Ala 與 Asp308Ala 兩突變酵素的 k_{cat} 值降低 60% 之多。 K_m 值顯示，除了 Asp380Ala 以外，Asp61Ala 與基質的親合性最低。Asp61Ala 之催化效率(k_{cat}/K_m)降低達 83% 之多，Asp308Ala 和 Asp339Ala 也降低了 70%。根據以上數據初步推測：Asp-380 可能為 *B. stearothermophilus* LAPII 酵素結構的關鍵胺基酸之一，而 Asp-61、Asp-308 和 Asp-339 則可能在酵素催化功能上扮演重要的角色。

2 Asp 變異酵素之鈷離子親合性

B. stearothermophilus 的 LAP_{II} 為鈷離子依賴型金屬酵素，因此測試 Asp 變異酵素的鈷離子親合性，有助於了解 Asp 殘基在鈷離子結合上所扮演的角色。由表七和表十顯示，Asp-61 被置換成 alanine 時，與鈷離子的親合性遠低於置換成 glutamic acid，此結果說明 Asp-61 的羧基支鏈在鈷離子結合上可能扮演重要的角色。Asp-180 被置換成 alanine 和 glutamic acid 時，在添加高濃度 Co^{2+} 離子的條件下皆無法測得酵素活性，故推測 Asp-380 可能為酵素結構的關鍵胺基酸殘基。

3. EDTA 處理後 Asp 變異酵素之再活化作用

經 EDTA 處理的 *B. stearothermophilus* 原生型 LAP_{II} 及 rLAP_{II}，會完全喪失酵素活性，於添加 Co^{2+} 離子後可恢復至最高活性。同樣的實驗可來評估 Co^{2+} 離子對突變酵素是否具有相同的影響。由圖十六結果顯示，經 EDTA 處理的 apo-Asp380Ala 依然無法恢復活性，而 apo-Asp61Ala 活性恢復的情形非常微弱，其他突變酵素尚能恢復大約 70% 的活性。此外，圖二十一結果則顯示 apo-Asp61Glu 活性的恢復情形明顯改善。這些數據都支持前述推測：Asp-61 的羧基支鏈在鈷離子結合上可能扮演重要的角色，Asp-380 可能為酵素結構的關鍵胺基酸殘基。

四、組織胺酸(Histidine)殘基在酵素之催化作用中扮演的角色

1. 酵素純化與動力學分析

野生型與組織胺酸突變酵素之比活性結果如表八所示，His345Leu 和 His378Leu 兩者不具酵素活性，活性染色也有相同的結果。 K_m 值顯示，

His227Leu 與基質的親合性明顯下降，且 His227Leu 的催化效率(k_{cat}/K_m)比野生型酵素降低約 40%；而 His191Leu 的催化效率則比野生型增加。初步推測：His-345 和 His-378 可能為 *B. stearothermophilus* LAP II 酵素結構的關鍵胺基酸殘基。

2. His 變異酵素之鈷離子親合性

由表九和表十結果顯示，His-345 和 His-378 置換為 leucine 或 arginine，都無法表現酵素活性，因此推測，His-345 和 His-378 在 *B. stearothermophilus* LAP II 酵素結構上扮演重要的角色。

3. EDTA 處理後 His 變異酵素之再活化作用

圖十九顯示 EDTA 處理後 His 變異酵素之再活化作用，在添加 10 μ M CoCl₂ 後，apo-His345Leu 和 apo-His378Leu 兩者完全無法恢復活性，而 His191Leu 和 His227Leu 活性恢復之情形更甚於野生型酵素。圖二十一結果發現 apo-His345Arg 和 apo-His378Arg 在添加 10 μ M CoCl₂ 後，同樣無法恢復活性。以上數據都支持前述推測：His-345 和 His-378 的 imidazole group 可能在酵素結構上扮演重要的角色。

參考文獻

1. **Amemura, A., R. Chakraborty, M. Fujita, T. Noumi, and M. Futai. 1988.** Cloning and nucleotide sequence of the isoamylase gene from *Pseudomonas amyloclavata* SB-15. *J. Biol. Chem.* *263*, 9271-9275.
2. **Arora, G., and B.H. Lee, 1994.** Purification of an aminopeptidase from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* S93. *Biotechnol. Appl. Biochem.* *19*, 179-192.
3. **Barrett, A.J. 1994.** Classification of peptidases. *Methods Enzymol.* *244*, 1-15.
4. **Beninga, J., K.L. Rock and A.L. Goldberg. 1998.** Interferon- γ can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* *273*, 18734-18742.
5. **Bott, R., M. Ultsch, A. Kossiakoff, T. Graycar, I. Katz, and S. Power. 1988.** The three-dimensional structure of *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin at 1.8Å and an analysis of the structural consequences of peroxide inactivation. *J. Biol. Chem.* *263*, 7895-7900.
6. **Burley, S.K., P.R. David, A. Taylor and W. N. Lipscomb. 1990.** Molecular structure of leucine aminopeptidase at 2.7-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *87*, 6878-6882.
7. **Burley, S.K., P.R. David and R.M. Sweet. 1992.** Structure determination and refinement of bovine lens leucine aminopeptidase and its complex with bestatin. *J. Mol. Biol.* *224*, 113-140.
8. **Cadwell, R.C., and C.F. Joyce. 1992.** Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods and Appl.* *2*, 28-33.
9. **Chao, W. S., V. Pautot, F. M. Holzer and L. L. Walling. 2000.** Leucine amino-peptidases: the ubiquity of LAP-N and the specificity of LAP-A. *Planta* *210*, 563-573.
10. **Chevrier, B., C. Schalk, H. D'Orchymont, J.M. Rondeau, D. Moras, and C. Tarnus, 1994.** Crystal structure of *Aeromonas proteolytica* aminopeptidase: a prototypical member of the co-catalytic zinc enzyme. *Structure* *2*, 283-291.
11. **Chien, H.R., C.L. Hsu, H.Y. Hu, W.C. Wang, and W.H. Hsu. 2002.** Enhancing oxidative resistance of *Agrobacterium radiobacter* N-carbamoyl

D-amino acid amidohydrolase by engineering solvent-accessible methionine residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 282-287.

- 12. Clemente, A., J. Vioque, R. Sanchez-Vioque, J. Pedroche, and Millan, F. 1999.** Production of extensive chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates with reduced antigenic activity. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3776-3781.
- 13. Clemente, A. 2000.** Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trend Food Sci. Technol.* 11, 254-262.
- 14. Conlin, C.A., K. Hakensson, A. Liljas and C.G. Miller. 1994.** Cloning and nucleotide sequence of the cyclic AMP receptor protein-regulated *Salmonella typhimurium pepE* gene and crystallization of its product, an α -aspartyl dipeptidase. *J. Bacteriol.* 176, 166-172.
- 15. Estell, D.A., Graycar, T.P., and J.A. Wells. 1985.** Engineering an enzyme by site-directed mutagenesis to be resistant to chemical oxidation. *J. Biol. Chem.* 260, 6518-6521.
- 16. Freeman, S.K. 1974.** Applications of Laser Raman Spectroscopy, John Wiley & Sons.
- 17. Frokjaer, S. 1994.** Use of hydrolysates for protein supplementation, *Food Technol.* 48, 89-88.
- 18. Gill, I., R. Lopez-Fandino, X. Jorba, and Vulfson, E.N. 1996.** Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enzyme Microbial Technol.* 18, 162-183.
- 19. Glusker, J.P. 1991.** Structural aspects of metal liganding to functional groups in proteins. *Adv. Protein Chem.* 42, 1-76.
- 20. Goldfrey, T., and S. West. 1996.** Industrial enzymology, 2nd ed., p. 3. Macmillan Publishers Inc., New York, N.Y.
- 21. Gonzales, T. and J. Robert-Baudouy. 1996.** Bacterial aminopeptidases: properties and functions. *FEMS Micro. Rev.* 18, 319-344.
- 22. Hagihara, H., K. Igarashi, Y. Hayashi, K. Endo, K. Ikawa-Kitayama, 2001.** Novel alpha-amylase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the alkaliphilic *Bacillus* isolate KSM-K38. *Appl.*

Environ. Microbiol. 67, 1744-1750.

- 23. Hayes, C.S., Illades-Aguiar, B., Casillas-Martinez, L., and P. Setlow. 1998.** In vitro and in vivo oxidation of methionine residues in small, acid soluble spore proteins from *Bacillus* species. *J. Bacteriol.* 180, 2694-2700.
- 24. He, F.C., L.B. Liu, and X.Y. Li. 1990.** Molecular models constructed in an easy way. Part 1. Models of tetrahedron, trigonal bipyramid, octahedron, pentagonal bipyramid and capped octahedron. *J. Chem. Educ.* 67, 556-558.
- 25. Hochuli, E., W. Bannwarth, H. Dobeli, R. Gentz, and D. Stüber. 1988.** Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Bio. Technology* 6, 1321-1325.
- 26. Hooper, N.M. 1994.** Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* 354, 1-6.
- 27. Johnson, D., and J. Travis. 1979.** The oxidation inactivation of human α -1-proteinase inhibitor. Further evidence for methionine at the reactive center. *J. Biol. Chem.* 254, 4022-4026.
- 28. Ju, S.S., L.L. Lin, W.C. Wang, and W.H. Hsu. 2000.** A conserved aspartate is essential for FAD binding and catalysis in the D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*. *FEBS Lett.* 436, 119-122.
- 29. Kachurin, A.M., A.M. Golubev, M.M. Geisow, O.S. Veselkina, L.S. Isaeva-Ivanova, and K.N. Neustroev, 1995.** Role of methionine in the active site of alpha-galactosidase from *Trichoderma reesei*. *Biochem. J.* 308, 955-964.
- 30. Keck, R.G. 1996.** The use of t-butyl hydroperoxide as a probe for methionine oxidation in protein. *Anal. Biochem.* 236, 52-62.
- 31. Kim, H. and W.N. Lipscomb. 1994.** Structure and mechanism of bovine lens leucine aminopeptidase. *Adv. Enzymol. Rel. Areas Mol. Biol.* 68, 153-213.
- 32. Kobayashi, M., and Shimizu, S. 1999.** Cobalt proteins. *Eur. J. Biochem.* 261, 1-9.
- 33. Kunkel, T.A., J.D. Roberts, and R.A. Zakour. 1987.** Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotype selection. *Methods Enzymol.*

154, 367-382.

- 34.Kuo, L.Y., G.Y. Hwang, Y.J. Lai, S.L. Yang, and Lin, L.L. 2003.** Overexpression, purification, and characterization of the recombinant leucine aminopeptidase II of *Bacillus stearothermophilus*. *Curr. Microbiol.* *47*, 40-45.
- 35.Kuo, L.Y., G.Y. Hwang, S.L. Yang, Y.W. Hua, W.L. Chen, and Lin, L.L. 2004.** Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* leucine aminopeptidase II by hydrogen peroxide and site-directed mutagenesis of methionine residues on the enzyme. *Protein J.* *23*, 295-302.
- 36.Lacks, S. A., and S. S. Springhorn. 1980.** Renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *J. Biol. Chem.* *255*, 7467-7473.
- 37.Lalasisidis, G. 1978.** Four new methods of debittering protein hydrolysates and a fraction of hydrolysates with high content of essential amino acids. *Ann. Nutr. Aliment.* *32*, 709-723.
- 38.Lasch, J., W. Kudernatsch, and H. Hanson. 1973.** Bovine lens leucine aminopeptidase. Kinetic studies with activators and competitive inhibitors. *Eur. J. Biochem.* *34*, 53-57.
- 39.Levine, R.L., J. Moskovitz, and E.R. Stadman. 2000.** Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB Life* *50*, 301-307.
- 40.Lin, L.Y., H.I. Park, and L.J. Ming. 1997.** Metal-binding and active-site structure of di-zinc *Streptomyces griseus* aminopeptidase. *JBIC.* *2*, 744-749.
- 41.Magboul, A.A.A., and P.L.H. McSweeney, 1999.** Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus curvatus* DPC2024. *Int. Dairy J.* *9*, 107-116.
- 42.Manchenko, G.P. 1994.** Handbook of detection of Enzymes on electrophoretic gels. CRC Press, Tokyo.
- 43.Maras, B., H.M. Greenblatt, G. Shoham, A. Spungin-Bialik, S. Blumberg, and D. Barra, 1996.** Aminopeptidase from *Streptomyces griseus* : primary structure and comparison with other zinc-containing aminopeptidases. *Eur. J. Biochem.* *236*, 843-846.

- 44. McDonnell, M., R. Fitzgerald, I.N. Fhaolain, P.V. Jennings, and G. O’Cuinn. 1997.** Purification and characterization of aminopeptidase P from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *J. Dairy Res.* *64*, 399-407.
- 45. Melbye, S.W., and F.H. Carpenter. 1971.** Leucine aminopeptidase (bovine lens). *J. Biol. Chem.* *246*, 2459-2463.
- 46. Midorikawa, T., R. Abe, Y. Yamagata, T. Nakajima, and E. Ichishima. 1998.** Isolation and characterization of cDNA encoding chicken egg yolk aminopeptidase Ey. *Comp. Biochem. Physiol.* *119*, 513-520.
- 47. Minamiura, N., Y. Matsumura, and T. Yamamoto. 1972.** Bitter peptides in the casein digests with bacterial proteinase. II. A bitter peptide consisting of tryptophan and leucine. *J. Biochem. (Tokyo)* *72*, 841-848.
- 48. Mitsou, M.-Y., P. Rigolet, M.-P. Chapot-Chartier, M. Nardi, J.-C. Gripon, and S. Brunie. 1994.** Crystallization and preliminary X-ray analysis of PepC, a thiol aminopeptidase from *Lactococcus lactis* homologous to bleomycine hydrolase. *J. Mol. Biol.* *237*, 160-162.
- 49. Montel, M.C., M.P. Seronie, R. Talon, and M. Hébraud, 1995.** Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus sake*. *Appl. Environ. Microbiol.* *61*, 837-839.
- 50. Moser, P., G. Roncari, and Zuber, H. 1970.** Thermophilic aminopeptidases from *Bacillus stearothermophilus*. (II. AP I: physico-chemical properties; thermostability and activation; formation of the apo-enzyme and subunits) *Int. J. Protein Research* *2*, 91-207.
- 51. Motoshima, H., E. Minagawa, F. Tsukasaki, and S. Kaminogawa. 1997.** Cloning of gene of the aminopeptidase T family from *Thermus thermophilus* HB8 and *Bacillus stearothermophilus* NCIB8924: apparent similarity to the leucyl aminopeptidase family. *Biosci. Biotech. Biochem.* *61*, 1710-1717.
- 52. Mow, B. M., A. L. Blajeski, J. Chandra, and S. H. Kaufmann. 2001.** Apoptosis and the response to anticancer therapy. *Curr. Opin. Oncol.* *13*, 453-462.
- 53. Myrin, P.A., and B.V. Hofsten. 1974.** Purification and metal ion activation of an aminopeptidase (aminopeptidase II) from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochim. Biophys. Acta* *350*, 13-25.

- 54.Ney, K. H., and G. Retzlaff. 1985.** A computer program predicting the bitterness of peptides, esp. in protein hydrolysates, based on amino acid composition and chain length (computer Q), p. 543-550. *In* G. Charalambous (ed.), *The shelf life of foods and beverage: Proceedings of the 4th International Flavor Conference.* Elsevier, Amsterdam.
- 55.O'Brien, R.T., and Leon Campbell, Jr. L. 1957.** Purification and properties of a proteolytic enzyme from *Bacillus stearothermophilus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 70, 432-441.
- 56.Peracchi, A. 2001.** Enzyme catalysis: removing chemically 'essential' residues by site-directed mutagenesis. *Trends Biochem. Sci.* 226, 497-503.
- 57.Pulido-Cejudo, G., B. Conway, P. Proulx, R. Brown, and C. A. Izaguirre. 1997.** Bestatin-mediated inhibition of leucine aminopeptidase may hinder HIV infection. *Antiviral Res.* 36, 167-177.
- 58.Ramachandrin, L.K., and B. Witkop, 1964.** The interaction of mercuric acetate with indoles, tryptophan and proteins. *Biochemistry* 3, 1603-1611.
- 59.Rao, M.B., A.M. Tanksale, M.S. Ghatge, and V.V. Deshpande. 1998.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 597-635.
- 60.Rawlings, N.D., and A.J. Barrett. 1995.** Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods Enzymol.* 248, 183-228.
- 61.Rhoads, M.L., and R.H. Fetterer. 1998.** Purification and characterization of a secreted aminopeptidase from adult. *Ascaris suum*. *Int. J. Parasitol.* 28, 1681-1690.
- 62.Roderick, S.L., and B.W. Matthews. 1988.** Crystallization of methionine aminopeptidase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 263, 16531-16538.
- 63.Roncari, G., and Zuber, H. 1969.** Thermophilic aminopeptidases from *Bacillus stearothermophilus*. (I. Isolation, specificity and general properties of the thermostable aminopeptidase I) *Int. J. Protein Research* 1, 45-61.
- 64.Rosenberg, S., P.J. Barr, R.C. Najarian, and R.A. Hallewell. 1984.** Synthesis in yeast of a functional oxidation-resistant mutant of human α 1-antitrypsin. *Nature* 312, 77-80.

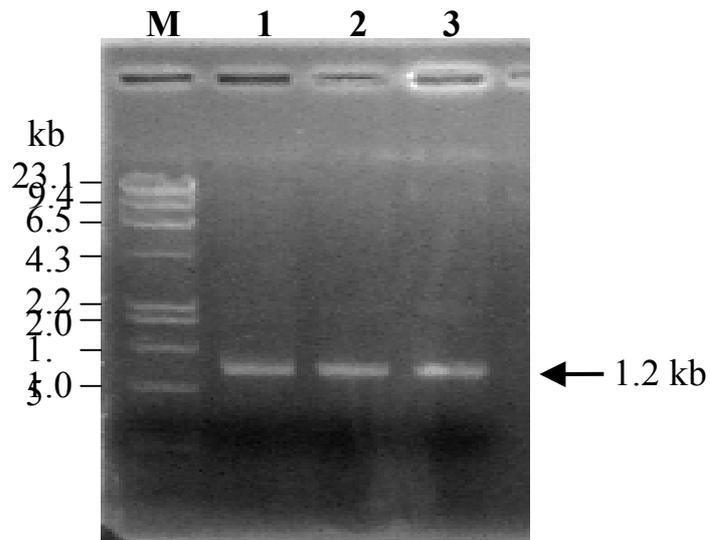
- 65.Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, New York
- 66.Schalk, C., J.-M. Remy, B. Chevrier, D. Moras, and C. Tarnus. 1992.** Rapid purification of the *Aeromonas proteolytica* aminopeptidase: crystallization and preliminary X-ray data. Arch. Biochem. Biophys. 294, 91-97.
- 67.Shibata, K.-I., and T. Watanabe. 1970.** Purification and characterization of an aminopeptidase from *Mycoplasma salivarium*. J. Bacteriol. 169, 3409-3413.
- 68.Stadtman, E.R. 1992.** Protein oxidation and aging. Science 257, 1220-1224.
- 69.Stadtman, E.R. 1993.** Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. Annu. Rev. Biochem. 62, 797-821.
- 70.Stoll, E., M.A. Hermodson, L.H. Ericsson, and H. Zuber. 1972.** Subunit structure of thermophilic aminopeptidase I from *Bacillus stearothermophilus*. Biochem. J. 11, 4731-4735.
- 71.Stoll, E., L.H. Ericsson, and H. Zuber. 1973.** The function of the two subunits of thermophilic aminopeptidase I. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70, 3781-3784.
- 72.Stoll, E., H.G. Weder, and H. Zuber. 1976.** Aminopeptidase II from *Bacillus stearothermophilus*. Biochim. Biophys. Acta 438, 212-220.
- 73.Strater, N., and W.N. Lipscomb. 1995.** Transition state analogue L-leucine-phosphonic and bound to bovine lens leucine aminopeptidase: X-ray structure at 1.65Å resolution in a new crystal form. Biochemistry 34, 9200-9210.
- 74.Tan, P.S., T.A. van Kessel, F.L. van de Veerdonk, P.F. Zuurendonk, A.P. Bruins, and W.N. Konings. 1993.** Degradation and debittering of a tryptic digest from beta-casein by aminopeptidase N from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. Appl. Environ. Microbiol. 59, 1430-1436.
- 75.Taylor, A. 1993a.** Aminopeptidase: structure and function. FASEB J. 7, 290-298.

- 76. Taylor, A. 1993b.** Aminopeptidases: towards a mechanism of action. Trends Biochem. Sci. *18*, 167-172.
- 77. Teh, L.C., Murphy, L.J., Hug, N.L., Surus, A.S., Friesen, H.G., Lararus, L., and G.E. Chapman. 1987.** Methionine oxidation in human growth hormone and human somatomammotropin. J. Biol. Chem. *262*, 6472-6477.
- 78. Torben, V.B., F.L., Søren, S. Lassen, and B.F. Henrik. 1995.** Oxidation stable amylases for detergent. Carbohydrate Bioengineering 175-179.
- 79. Tu, A.T. 1982.** Raman Spectroscopy in Biology, John Wiley & Sons.
- 80. Vogt, W. 1995.** Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. Free Rad. Biol. Med. *18*, 93-105.
- 81. Wang, Z.Y., Shimonaga, M., Muraoka, Y., Kobayashi, M., and T. Nozawa. 2001.** Methionine oxidation and its effect on the stability of a reconstituted subunit of the light-harvesting complex from *Rhodospirillum rubrum*. Eur. J. Biochem. *268*, 3375-3382.
- 82. Yoshimoto, T., T. Shimoda, A. Kitazono, T. Kabashima, K. Ito, and D. Tsuru. 1993.** Pyroglutamyl peptidase gene from *Bacillus amyloliquefaciens*: cloning, sequencing, expression, and crystallization of the expressed enzyme. *J. Biochem.* *113*, 67-73.
- 83. Zuber, H., and G. Roncari. 1967.** Thermostable and thermolabile aminopeptidases from *Bacillus stearothermophilus*. Angew. Chem. *79*, 906-911.

圖、表目錄

圖一、PCR 產物(<i>lap II</i>)之電泳分析.....	67
圖二、IPTG 濃度與誘導溫度對酵素大量表現之影響.....	68
圖三、pQE-LAPII 在 <i>E. coli</i> M15 所表現之細胞總蛋白分析.....	69
圖四、純化過程中收集 rLAPII 之蛋白質電泳分析圖.....	70
圖五、rLAPII 活性表現之最適 pH 值.....	71
圖六、rLAPII 活性表現之最適溫度及溫度穩定性.....	72
圖七、過氧化氫對 rLAPII 穩定性之影響.....	73
圖八、野生型與氧化型 rLAPII 之蛋白質電泳分析圖.....	74
圖九、酵素結構之拉曼光譜儀分析圖.....	75
圖十、甲硫胺酸殘基突變後之定序.....	76
圖十一、野生型與甲硫胺酸變異酵素之蛋白質電泳分析圖.....	77
圖十二、野生型與甲硫胺酸變異酵素之氧化穩定性.....	78
圖十三、M29 家族 胺基切割 之胺基酸序列比對.....	79
圖十四、天門冬酸定點突變之定序結果.....	81
圖十五、天門冬酸突變酵素的電泳分析與活性染色圖.....	82
圖十六、組織胺酸定點突變之定序結果.....	83
圖十七、組織胺酸突變酵素的電泳分析與活性染色圖.....	84
圖十八、EDTA 處理之野生型與天門冬酸變異酵素的再活化反應.....	85
圖十九、EDTA 處理之野生型與組織胺酸變異酵素的再活化反應.....	86
圖二十、天門冬酸與組織胺酸第二次定點突變之定序結果.....	87

圖二十一、EDTA 處理之野生型與變異酵素的再活化反應.....	88
表一、His ₆ -tagged rLAPII 之純化表.....	89
表二、rLAPII 之基質專一性.....	90
表三、不同金屬離子與試劑對 rLAPII 活性之影響.....	91
表四、rLAPII 定點突變所使用的引子.....	92
表五、野生型與甲硫胺酸變異酵素之比活性動力學參數.....	93
表六、野生型與天門冬酸變異酵素之比活性動力學參數.....	94
表七、野生型與 Asp 變異酵素之鈷離子親合性.....	95
表八、野生型與組織胺酸變異酵素之比活性動力學參數.....	96
表九、野生型與 His 變異酵素之鈷離子親合性.....	97
表十、Asp 與 His 變異酵素的鈷離子親合性.....	98
附圖一、蛋白水解液去除苦味的機制.....	99
附圖二、甲硫胺酸的結構及其氧化產物.....	100
附圖三、SAP 活化中心之構造圖.....	101
附圖四、金屬離子與其配位體鍵結所形成的各種形狀.....	102
附圖五、APII、AP-T 與 AP-Th 胺基酸序列之比對.....	103
附圖六、AP-T 家族 C 端胺基酸序列之比對.....	104
附圖七、Met AP 及 nitrile hydratase 之活性中心.....	105
附圖八、QuikChang 定點突變法的流程圖.....	106
附圖九、 <i>B. stearothermophilus</i> LAP II 之基因與胺基酸序列.....	107



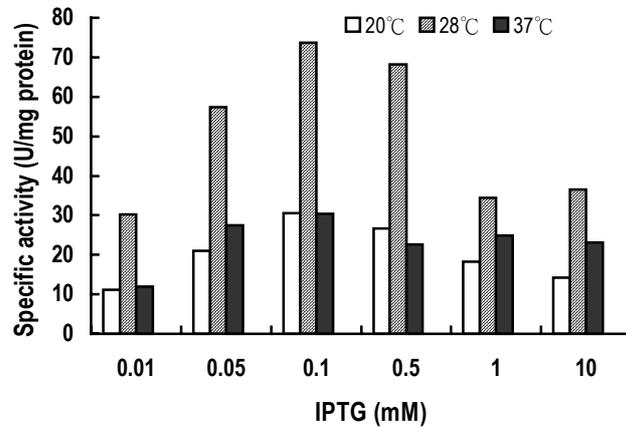
圖一、PCR 產物之電泳分析。

針對 *B. stearothermophilus* LAP II 所設計的引子，所得產物為 1.2 kb 的 *lap II*。

Fig. 1 Electrophoresis analysis of the product of PCR.

In order to obtain the product of *lap II* with 1.2 kb, the primer for *B. stearothermophilus* LAP II was designed.

b

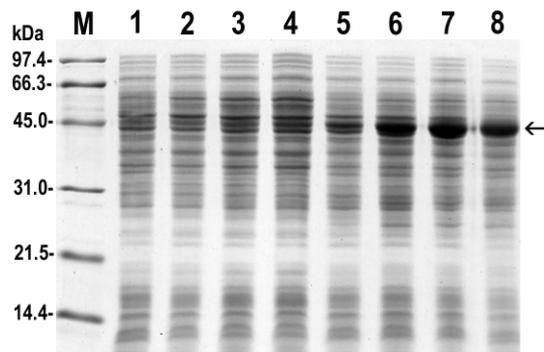


圖二、IPTG 濃度與誘導溫度對 LAPII 大量表現之影響。

IPTG 使用濃度分別為 0.01、0.05、0.1、0.5、1 和 10 mM，誘導溫度則分別為 20°C、28°C 以及 37°C。

Fig. 2 Effect on the overexpression of LAPII by different IPTG concentration and inductive temperatures.

The concentration of IPTG were 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 and 10 mM, respectively. The incubation temperature of IPTH induction were 20°C, 28 °C and 37 °C, respectively.

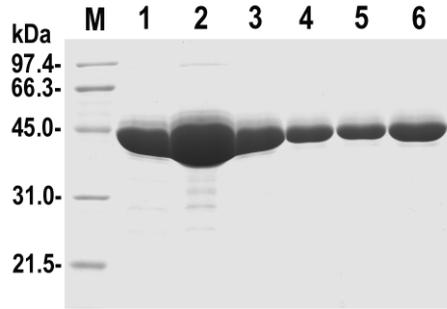


圖三、由 *E. coli* M15 生產之重組 LAPII 產物分析。

以 10% SDS-PAGE 分析細胞總蛋白質並以 Coomassie Brilliant Blue 染色。Lanes：M，標準分子量蛋白質；1，無 IPTG 誘導的 1 小時培養液；2，無 IPTG 誘導的 3 小時培養液；3，無 IPTG 誘導的 6 小時培養液；4，無 IPTG 誘導的 24 小時培養液；5，加 IPTG 誘導的 1 小時培養液；6，加 IPTG 誘導的 3 小時培養液；7，加 IPTG 誘導的 6 小時培養液；8，加 IPTG 誘導的 24 小時培養液。

Fig. 3 Analysis of the recombinant LAPII produced by *E. coli* M15.

The total cell proteins were analyzed with 10% SDS-PAGE, and visualized by Coomassie Brilliant Blue staining. Lanes: M, molecular weight marker of protein standard; 1, 1 h incubation without IPTG; 2, 3 h incubation without IPTG; 3, 6 h incubation without IPTG; 4, 24 h incubation without IPTG; 5, 1 h incubation with IPTG; 6, 3 h incubation with IPTG; 7, 6 h incubation with IPTG; 8, 24 h incubation with IPTG.

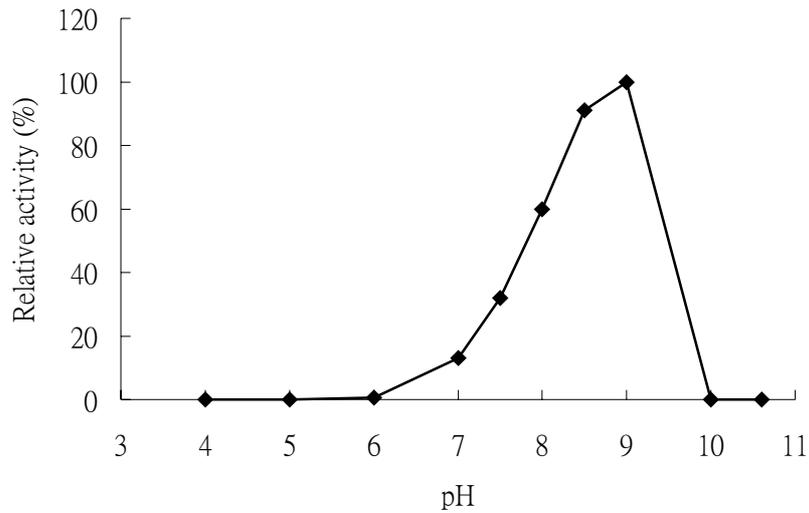


圖四、純化過程中收集 rLAPII 之蛋白質電泳分析。

以 10% SDS-PAGE 分析並以 Coomassie Brilliant Blue 染色。Lanes：M，標準分子量蛋白質；1~6 依序為純化回收的管柱號碼。

Fig. 4 Electrophoresis analysis of the rLAPII protein collection during the purification procedure.

The proteins were analyzed with 10% SDS-PAGE, and visualized by Coomassie Brilliant Blue staining. Lanes: M, molecular weight marker of protein standard; 1~6 indicated the fraction collection number of purification.

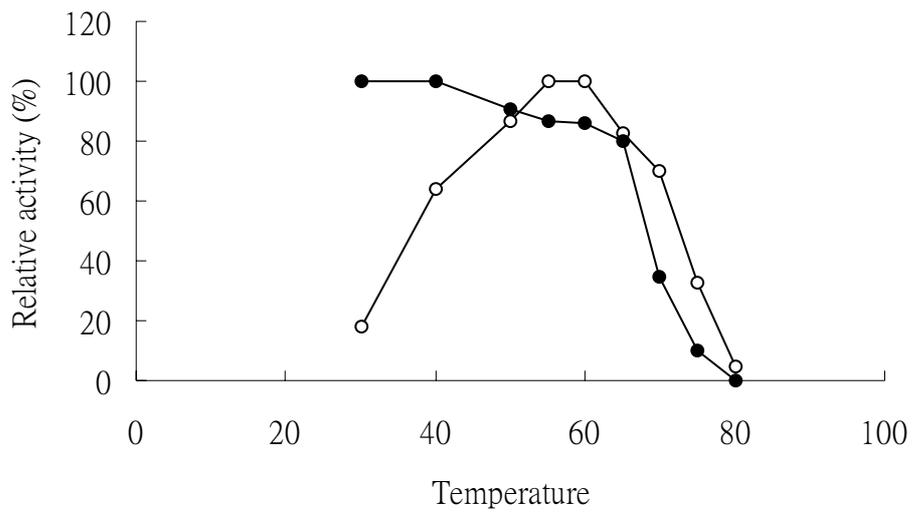


圖五、rLAPII 活性表現之最適 pH 值。

緩衝液配製如下：pH 3.0-7.0 緩衝液為 20 mM Citrate-phosphate；pH 6.0-8.0 緩衝液為 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ ；pH 7.1-9.0 緩衝液為 20 mM Tris-HCl 以及 pH 8.6-10.6 緩衝液為 20 mM Glycine-NaOH。

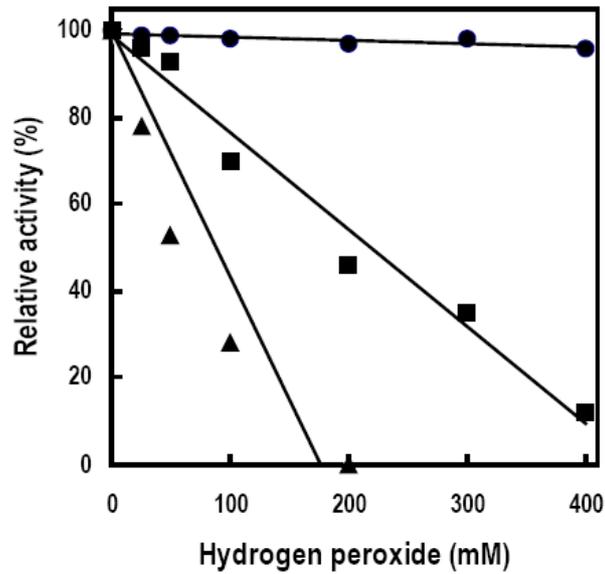
Fig. 5 Effect of pH on the activity of rLAPII.

Buffers used were as follow: 20 mM Citrate-phosphate (pH 3.0-7.0); 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 6.0-8.0); 20 mM Tris-HCl (pH 7.1-9.0) and 20 mM Glycine-NaOH (8.6-10.6).



圖六、溫度對 rLAPII 活性(○)及穩定性(●)之影響。

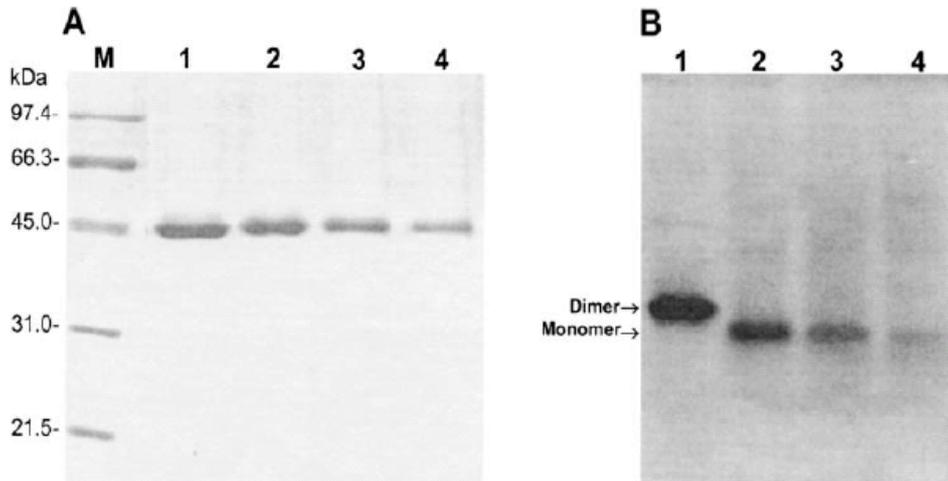
Fig. 6 Effect of temperature on activity (○) and stability (●) of rLAPII.



圖七、過氧化氫對 rLAPII 活性之影響。

純化酵素分別在(●)4°C；(■)30°C 和(▲)55°C 等溫度下靜置於不同濃度之 H₂O₂ 與 50 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0)中。殘餘活性則以未經 H₂O₂ 處理之酵素活性對照換算成百分比之相對活性。

Fig. 7 Inactivation of the purified rLAPII by H₂O₂. The enzyme was incubated in the presence of fresh H₂O₂ and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) at (●) 4°C ; (■) 30 °C and (▲) 55 °C, respectively. Residual activity is expressed as a percentage of a nontreated enzyme control.

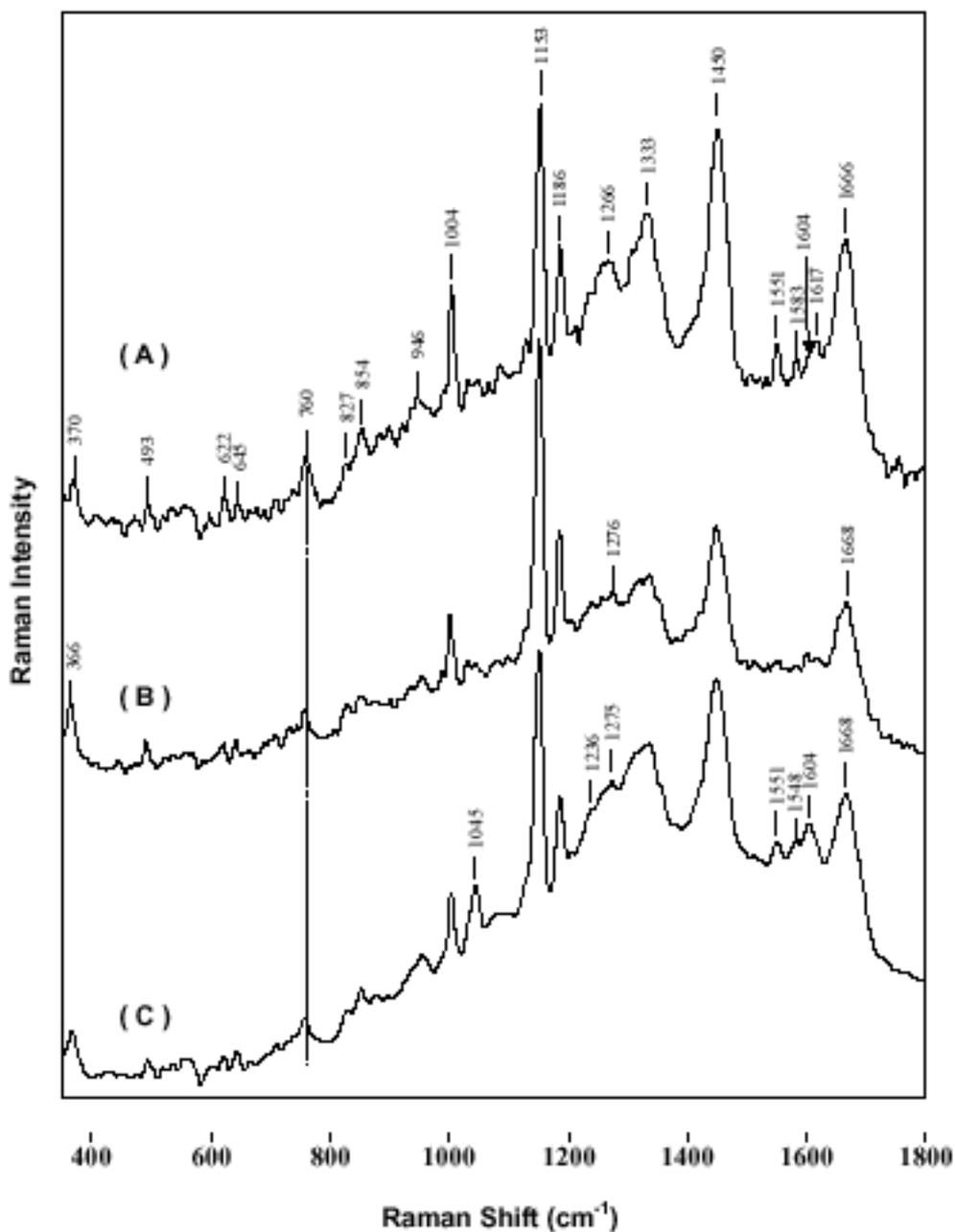


圖八、原型與氧化型 rLAPII (A)SDS 膠體與(B)不含 SDS 膠體之蛋白質電泳分析圖。

進行電泳分析之前，先將酵素在 55°C 下培養於不同濃度之 H₂O₂ 內 30 分鐘。Lanes：M，蛋白質標準品；1，原型 rLAPII；2，以 50 mM H₂O₂ 處理之 rLAPII；3，以 100 mM H₂O₂ 處理之 rLAPII；4，以 300 mM H₂O₂ 處理之 rLAPII。

Fig. 8 Analysis of native and oxidized forms of rLAPII by (A) SDS-PAGE and (B) nondenaturing PAGE.

Before electrophoresis, the enzyme was incubated with the indicated concentrations of H₂O₂ at 55°C for 30 min. Lanes: M, molecular mass marker; 1. native rLAPII; 2, rLAPII treated with 50 mM H₂O₂; 3, rLAPII treated with 100 mM H₂O₂; 4, rLAPII treated with 300 mM H₂O₂.



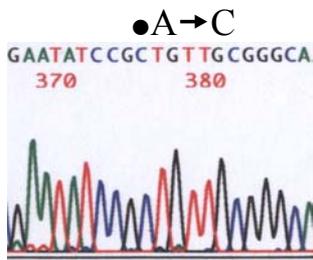
圖九、拉曼光譜儀分析原型與氧化型 rLAPII 之結構。

(A),未經 H₂O₂ 處理之原型 rLAPII; (B),以 50 mM H₂O₂ 處理之 rLAPII; (C),以 300mM H₂O₂ 處理之 rLAPII。

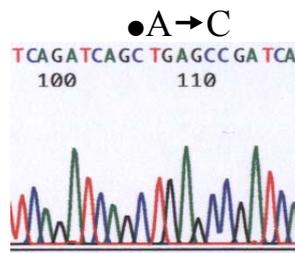
Fig. 9 FT-Raman spectra of native and oxidized forms of rLAPII.

A, native rLAPII; B, rLAPII treated with 50 mM H₂O₂; C, rLAPII treated with 300 mM H₂O₂.

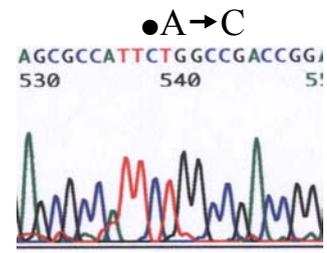
M82L_(For)



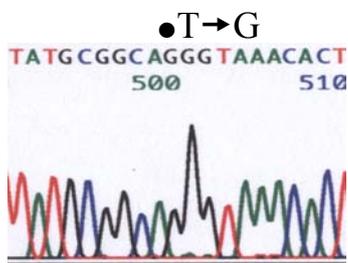
M88L_(For)



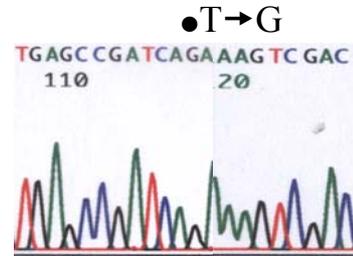
M136L_(For)



M254L_(Rev)

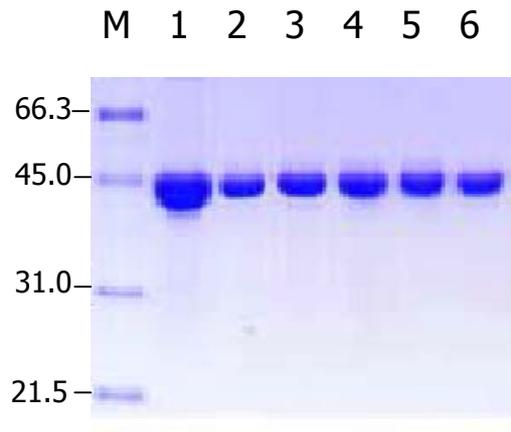


M382L_(Rev)



圖十、*B. stearotherophilus* rLAPII DNA 序列中甲硫胺酸經定點突變的相對位置。

Fig. 10 The surrounding DNA sequence at the specific methionine site of *B. stearotherophilus* rLAPII.

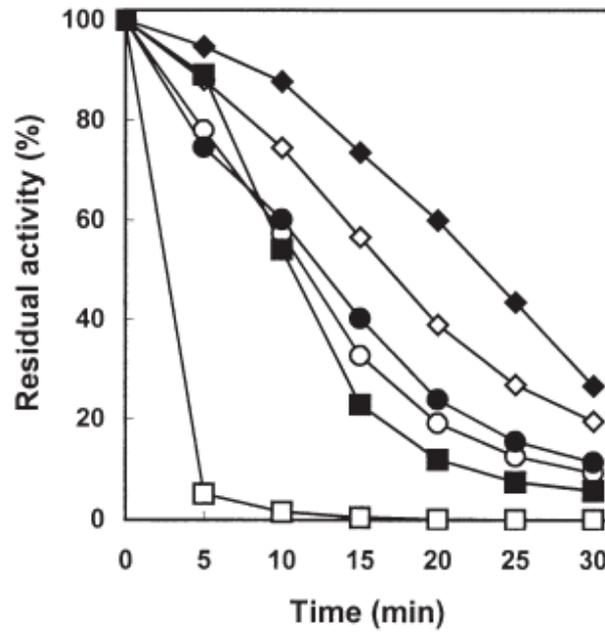


圖十一、野生型與甲硫胺酸變異酵素之 SDS-PAGE 電泳分析圖。

Lanes: M, 標準分子量蛋白質；1, wild-type；2, Met82LeuM；3, Met88Leu；4, Met136Leu；5, Met254Leu；6, Met382Leu。

Fig. 11 SDS-PAGE analysis of wild-type and methionine mutant enzymes.

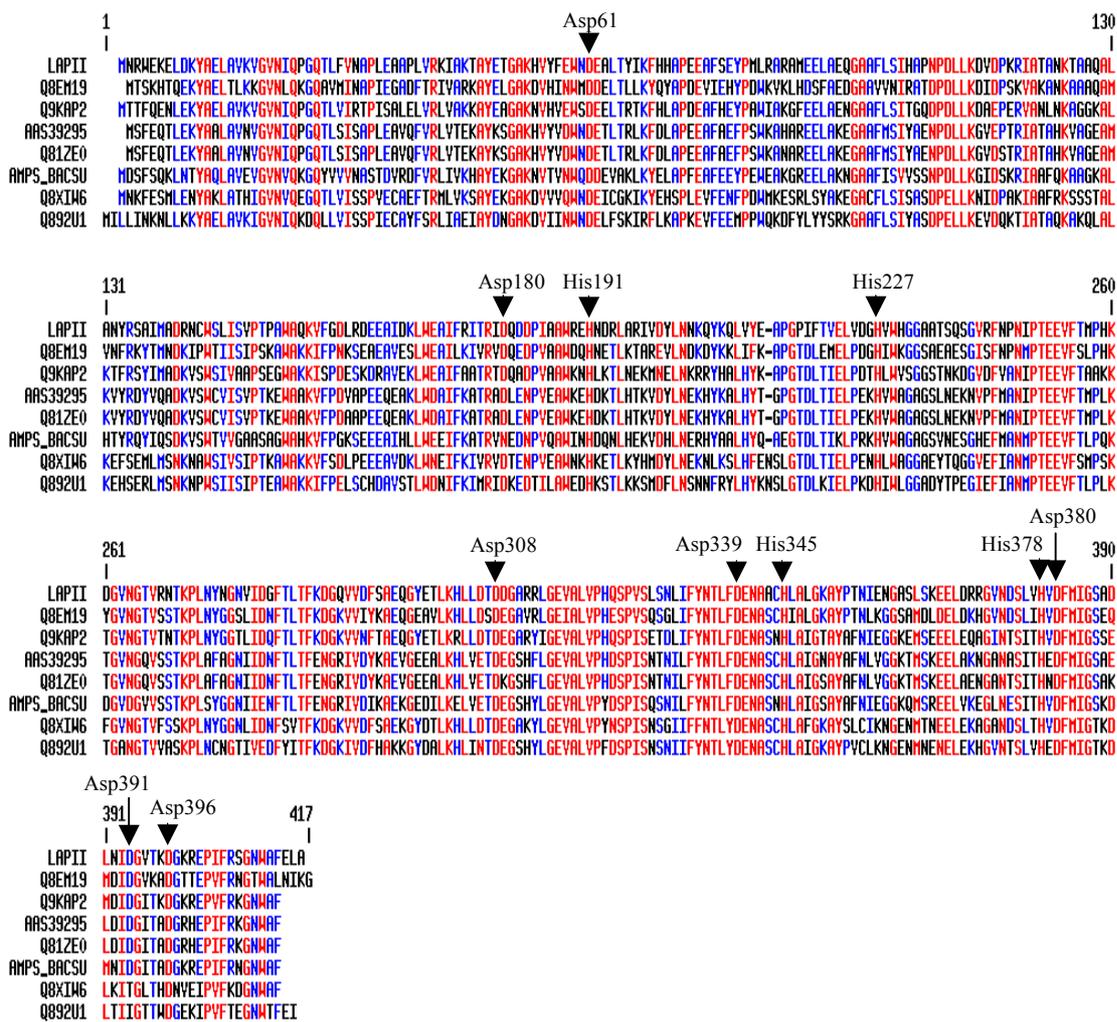
Lanes: M, 標準分子量蛋白質；1, wild-type; 2, Met82LeuM; 3, Met88Leu; 4, Met136Leu; 5, Met254Leu; 6, Met382Leu.



圖十二、野生型與甲硫胺酸突變酵素之氧化穩定性。

符號說明：◆代表 wild-type enzyme；□代表 Met82Leu；◇代表 Met88Leu；○代表 Met136Leu；■代表 Met254Leu；●代表 Met382Leu。

Fig. 12 Oxidative stability of the purified wild-type and mutant rLAPIIs. Wild-type and mutant enzymes were incubated in the presence of fresh H_2O_2 at the indicated times. Symbols : (◆), wild-type enzyme; (□), Met82Leu; (◇), Met88Leu; (○), Met136Leu; (■), Met254Leu; (●), Met382Leu.



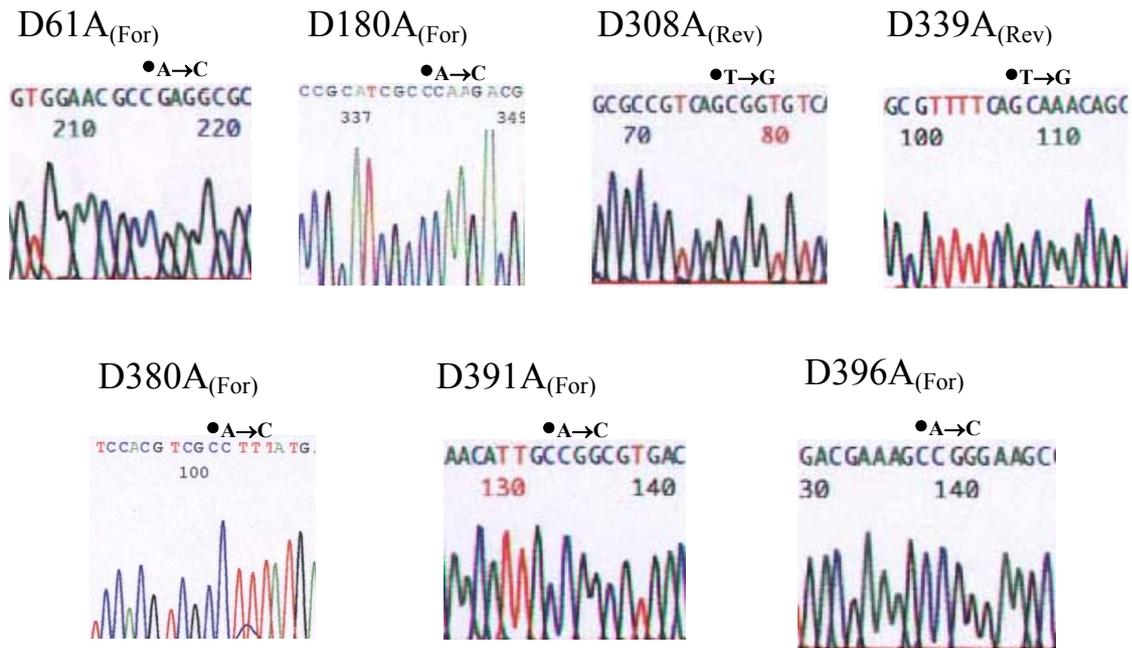
圖十三、M29 家族肽胺基切割酶之胺基酸序列比對。

相關縮寫如下：LAPII 來自 *B. stearothermophilus*；Q9KAP2 來自 *B. halodurans*；Q8EM19 來自 *Oceanobacillus iheyensis*；AAS39295 來自 *B. cereus* ATCC 10987；Q81ZE0 來自 *B. anthracis* Ames；Q8XIW6 來自 *Clostridium perfringens*；AMPS_BACSU 來自 *B. subtilis*；Q892U1 來自 *C. tetani*。高保留胺基酸殘基以紅色字體表示；低保留胺基酸殘基則以藍色字體表示。

(續上頁)

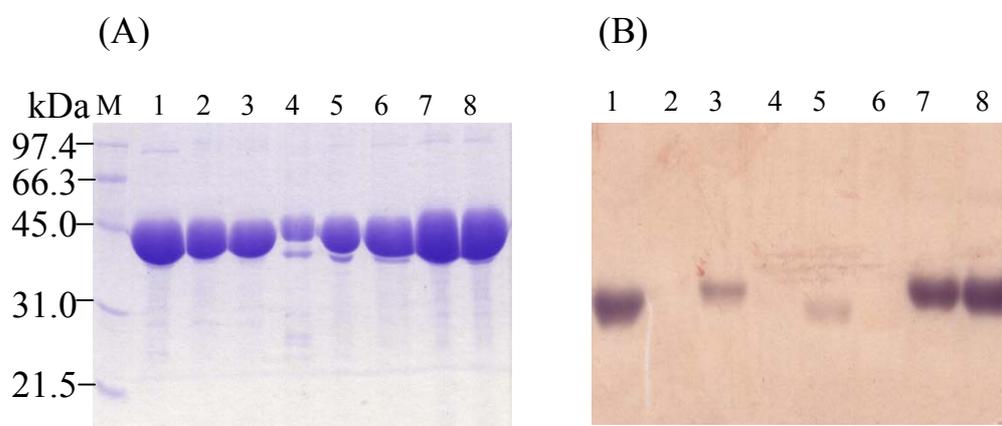
Fig. 13 Multiple alignment of aminopeptidases from M29 family.

The abbreviations of the sources of the individual leucine aminopeptidase : LAP11, *B. stearothermophilus*; Q9KAP2, *B. halodurans*; Q8EM19, *Oceanobacillus iheyensis*; AAS39295, *B. cereus* ATCC 10987; Q81ZE0, *B. anthracis* Ames; Q8XIW6, *Clostridium perfringens*; AMPS_BACSU, *B. subtilis*; Q892U1, *C. tetani*. The red color indicate that residue with high consensus; and the blue color indicate low conserved residues.



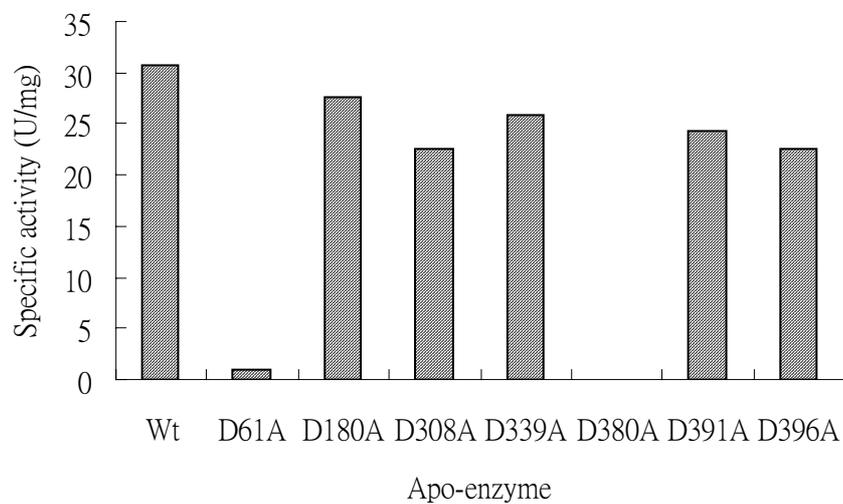
圖十四、*B. stearotherophilus* rLAPII DNA 序列中天門冬酸經定點突變的相對位置。

Fig. 14 The surrounding DNA sequence at the specific aspartic acid site of *B. stearotherophilus* rLAPII.



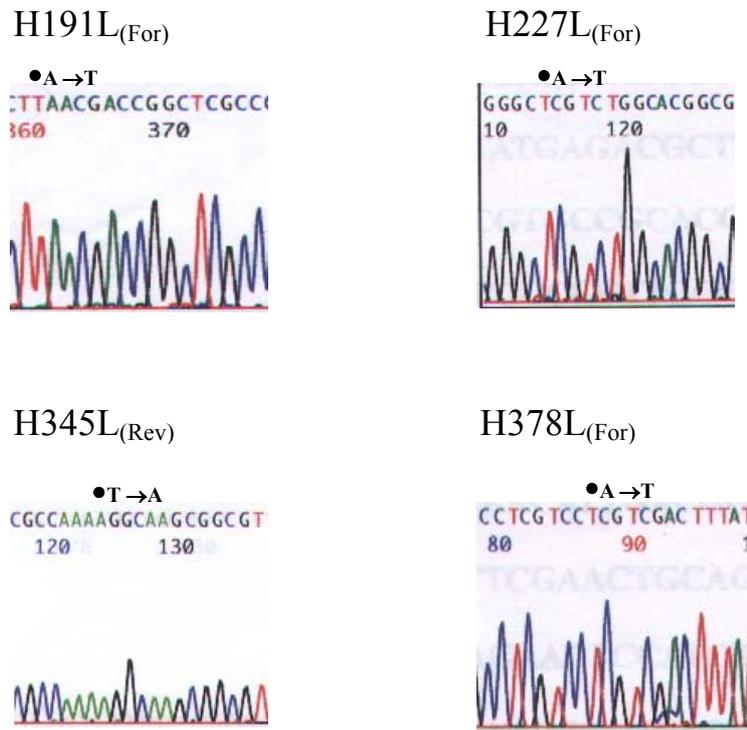
圖十五、天門冬酸突變酵素之SDS-PAGE電泳分析(A)與native PAGE活性染色(B)。Lanes：M, 標準分子量蛋白質；1, wild-type；2, Asp61Ala；3, Asp180Ala；4, Asp308Ala；5, Asp339Ala；6, Asp380Ala；7, Asp391Ala；8, Asp396Ala。

Fig. 15 SDS-PAGE analysis (A) and activity staining on native PAGE (B) of Asp mutant enzymes. Lanes：M, molecular weight marker of protein standard; 1, wild-type; 2, Asp61Ala; 3, Asp180Ala; 4, Asp308Ala; 5, Asp339Ala; 6, Asp380Ala; 7, Asp391Ala; 8, Asp396Ala.



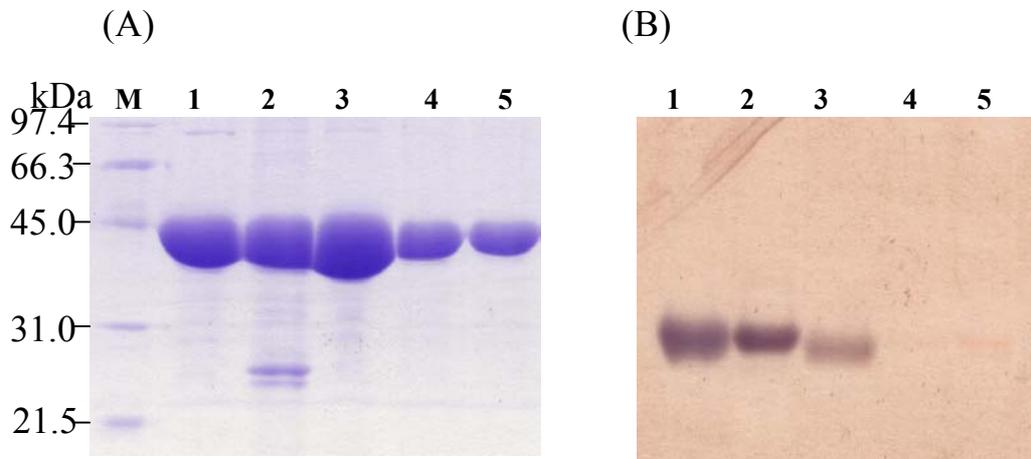
圖十六、EDTA 處理之野生型與 Asp 變異酵素的再活化反應。
 Co^{2+} 添加量為 $10 \mu\text{M}$ 。

Fig. 16 Reactivation of EDTA-treated wild-type and Asp mutatic enzymes by $10 \mu\text{M} \text{Co}^{2+}$ addition.



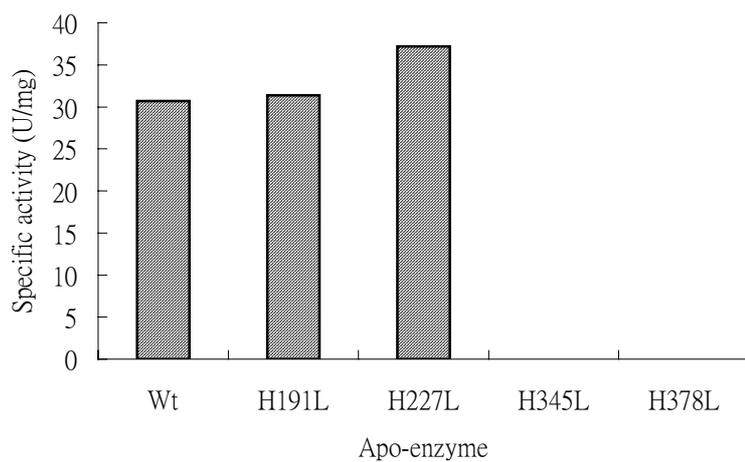
圖十七、*B. stearothermophilus* rLAPII DNA 序列中組織胺酸經定點突變的相對位置。

Fig. 17 The surrounding DNA sequence at the specific histidine site of *B. stearothermophilus* rLAPII.



圖十八、組織胺酸突變酵素之 SDS-PAGE 電泳分析(A)與 native PAGE 活性染色(B)。Lanes：M, 標準分子量蛋白質；1, wild-type；2, His191Leu；3, His227Leu；4, His345Leu；5, His378Leu。

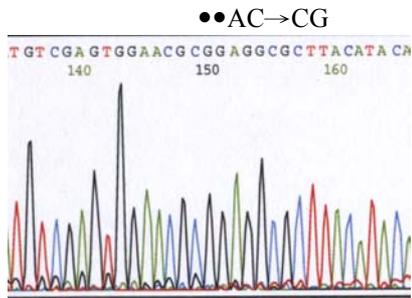
Fig. 18 SDS-PAGE analysis (A) and activity staining on native PAGE (B) of His mutant enzymes. Lanes：M, molecular weight marker of protein standard; 1, wild-type; 2, His191Leu; 3, His227Leu; 4, His345Leu; 5, His378Leu.



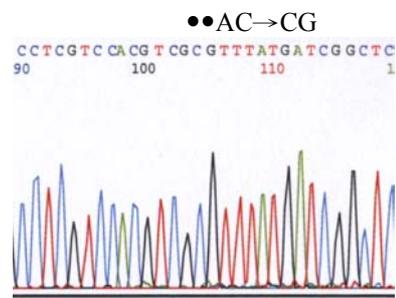
圖十九、EDTA 處理之野生型與 His 變異酵素的再活化反應。
Co²⁺ 添加量為 10 μM。

Fig. 19 Reactivation of EDTA-treated wild-type and His mutant enzymes by 10 μM Co²⁺ addition.

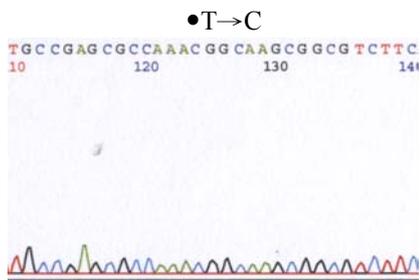
D61E_(For)



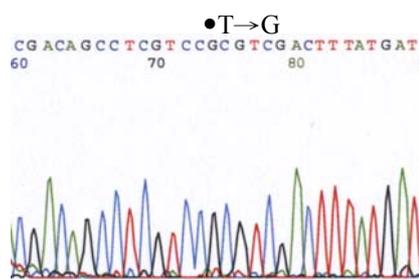
D380E_(For)



H345R_(Rev)

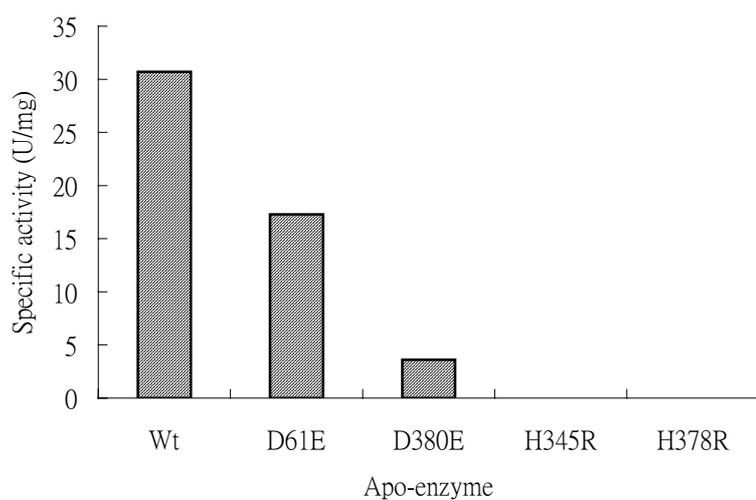


H378R_(For)



圖二十、*B. stearothermophilus* rLAPII DNA 序列中天門冬酸與組織胺酸經定點突變的相對位置。

Fig. 20 The surrounding DNA sequence at the specific aspartic acid and histidine site of *B. stearothermophilus* rLAPII.



圖二十一、EDTA 處理之野生型與變異酵素的再活化反應。
Co²⁺ 添加量為 10 μM。

Fig. 21 Reactivation of EDTA-treated wild-type and mutant enzymes by 10 μM Co²⁺ addition.

表一、His₆-tagged rLAPII 之純化表。

Table 1 Purification scheme for the His₆-tagged rLAPII.

Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	2560	55	46	100	1
Ni-NTA	1957	4.6	425	76	9.2

表二、rLAPII 的基質專一性。

Table 2 Substrate specificity of rLAPII.

Substrate (1 mM)	Specific activity (U/mg)	Relative activity (%)
Leu-NA	23.43	100
Arg-NA	10.87	46.3
Lys- NA	8.87	37.8
Ala- NA	3.87	15.2
Pro-NA	0.07	0.3
Val-NA	0.05	0.2
Phe-Ala-NA	0.02	0.1
Glutamic acid-NA	0.02	0.1
Ala-Ala-Pro-Leu-NA	0.04	0.2

Purified AP II was incubated in 20mM Tris-HCl buffer (pH7.5) containing 1mM amino acid- ρ -nitroanilide at 55°C for 10 min. The reaction was stop by the addition of 10% acetic acid.

表三、不同金屬離子與試劑對 rLAPII 活性之影響。

Table 3 Effect of divalent cations and various reagents on rLAPII.

Reagents and/or conditions	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Control		100
EDTA ^a	1	13
	10	0
DTT ^b	1	8
	10	0
PMSF ^c	1	73
	10	0
Co ⁺²	1	381
Zn ⁺²	1	6
Mg ⁺²	1	106
Mn ⁺²	1	27
Ni ⁺²	1	11
Ca ⁺²	1	86
Cu ⁺²	1	0
Hg ⁺²	1	1
Inactivated by 10 mM EDTA and reactivated by:		
Co ⁺²	1	391
Zn ⁺²	1	2
Mg ⁺²	1	5
Mn ⁺²	1	13
Ni ⁺²	1	4
Ca ⁺²	1	27
Cu ⁺²	1	0
Hg ⁺²	1	0

^aEDTA, ethylenedinitrilo-tetraacetic acid.

^bDTT, dithiothreitol.

^cPMSF, phenylmethlsulfonyl fluoride.

表四、重組 *B. stearotheophilus* 白胺酸 胺基切割 II 定點突變所設計的引子。

Table 4 Primers used for site-directed mutagenesis of rLAPII from *B. stearotheophilus*.

突變酵素	引子序列
Met82Leu	5'-CGAATATCCG <u>CTG</u> TTCGCGGC-3'
Met88Leu	5'-GGGCAAGAGC <u>CTG</u> GGAAGAAC-3'
Met136Leu	5'-GAGCGCCATT <u>CTG</u> GCCGACCG-3'
Met254Leu	5'-AGTGTTTACC <u>CTG</u> CCGCATAA-3'
Met382Leu	5'-CGTCGACTTT <u>CTG</u> ATCGGCTC-3'
Asp61Ala	5'-GAGTGGAAC <u>GCC</u> GAGGCGCT-3'
Asp180Ala	5'-CACCCGCATC <u>GCC</u> CAAGACGG-3'
Asp308Ala	5'-GCTTGACACC <u>GCT</u> GACGGCGC-3'
Asp339Ala	5'-ACACGCTGTTT <u>GCT</u> GAAAACG-3'
Asp380Ala	5'-TCGTCCACGTC <u>GCC</u> TTTATGAT-3'
Asp391Ala	5'-ATCTGAACATT <u>GCC</u> GGCGTGAC-3'
Asp396Ala	5'-GCGTGACGAAAG <u>GCC</u> GGGAAGC-3'
His191Leu	5'-CCTGGCGCGAA <u>CTT</u> AACGACCG-3'
His227Leu	5'-CGTCGACGGG <u>CTC</u> GTATGGCAC-3'
His345Leu	5'-ACGCCGCTTGCC <u>TTT</u> TGGCGCTC-3'
His378Leu	5'-ACAGCCTCGTC <u>CTC</u> GTCGACTTT-3'
Asp61Glu	5'-GTCGAGTGGAAC <u>GCG</u> GAGGCGCT-3'
Asp308Glu	5'-CTTGCTTGACACC <u>GCG</u> GACGGCGC-3'
Asp380Glu	5'-CTCGTCCACGTC <u>GCG</u> TTTATGATCG-3'
His345Arg	5'-GACGCCGCTTGCC <u>GTT</u> TGGCGCTC-3'
His378Arg	5'-CAGCCTCGTC <u>GCG</u> GTCGACTTTATG-3'

表五、野生型與甲硫胺酸變異酵素之比活性動力學參數。

Table 5 Specific activities and kinetic parameters of wild-type and Met mutant enzymes.

Enzyme	Specific activity (U mg ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat} / K_m (min ⁻¹ mM ⁻¹)
Wild-type	133.4	0.9	17.3	19.2
Met82Leu	132.6	1.0	19.4	19.4
Met88Leu	131.1	0.9	20.1	22.3
Met136Leu	90.9	0.9	9.5	10.6
Met254Leu	116.7	0.8	17.0	21.3
Met382Leu	108.5	1.0	18.1	18.1

表六、野生型與天門冬酸變異酵素之比活性動力學參數。

Table 6 Specific activities and kinetic parameters of wild-type and Asp mutant enzymes.

Enzyme	Specific activity (U mg ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat} / K_m (min ⁻¹ mM ⁻¹)
Wild-type	133.4	0.9	17.3	19.2
Asp61Ala	15.5	2.2	7.0	3.2
Asp180Ala	85.0	1.3	16.5	12.7
Asp308Ala	3.5	1.1	6.8	6.2
Asp339Ala	32.3	1.7	10.0	5.9
Asp380Ala	Inactive	ND	ND	ND
Asp391Ala	93.8	1.2	18.9	15.8
Asp396Ala	92.3	1.3	26.2	20.2

ND, not determined

表七、野生型與 Asp 變異酵素之鈷離子親合性。

Table 7 Co²⁺ affinity of wild-type and Asp mutant rLAPIIs.

Enzymes	Specific activity (U/mg)	Co ²⁺ conc. (μ M)
Wt	29.3	5
D61A	26.7	5000
D180A	27.5	50
D308A	26.5	50
D339A	27.3	10
D380A	ND	—
D391A	27.2	10
D396A	30.0	5

¹The data showed that the Co²⁺ concentration addition for the highest specific activity of wild-type and Asp mutant rLAPIIs.

²ND, not detected.

表八、野生型與組織胺酸變異酵素之比活性動力學參數。

Table 8 Specific activities and kinetic parameters of wild-type and His mutant enzymes.

Enzyme	Specific activity (U mg ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat} / K_m (min ⁻¹ mM ⁻¹)
Wild-type	133.4	0.9	17.3	19.2
His191Leu	91.3	1.2	27.3	22.8
His227Leu	60.8	4.4	51.4	11.7
His345Leu	Inactive	ND	ND	ND
His378Leu	Inactive	ND	ND	ND

ND , not determined

表九、野生型與 His 變異酵素之鈷離子親合性。

Table 9 Co²⁺ affinity of wild-type and His mutant rLAPIIs.

Enzymes	Specific activity (U/mg)	Co ²⁺ conc. (μ M)
Wt	29.3	5
H191L	30.4	5
H227L	29.4	5
H345L	ND	—
H378L	ND	—

¹The data showed that the Co²⁺ concentration addition for the highest specific activity of wild-type and His mutant rLAPIIs..

²ND, not detected.

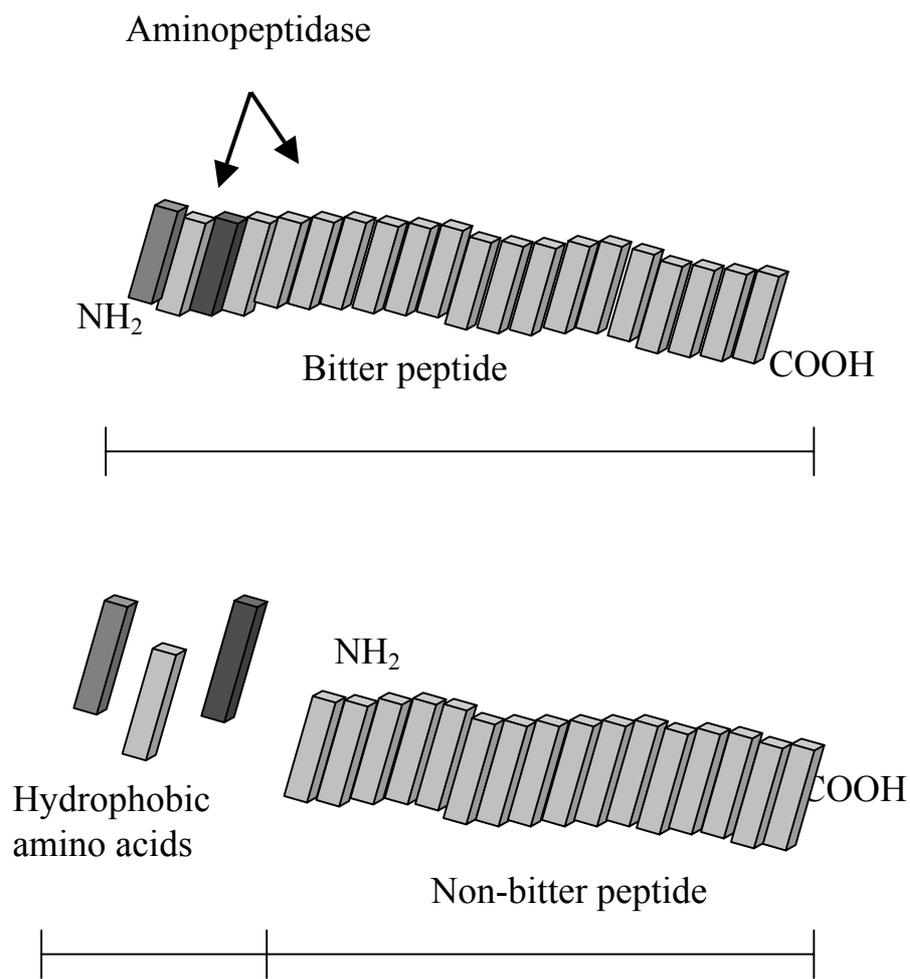
表十、Asp 與 His 變異酵素的鈷離子親合性。

Table 10 Co^{2+} affinity of Asp and His mutant rLAPIIs.

Enzymes	Specific activity (U/mg)	Co^{2+} conc. (μM)
Wild-type	29.3	5
D61E	29.2	10
D380E	ND	_____
H345R	ND	_____
H378R	ND	_____

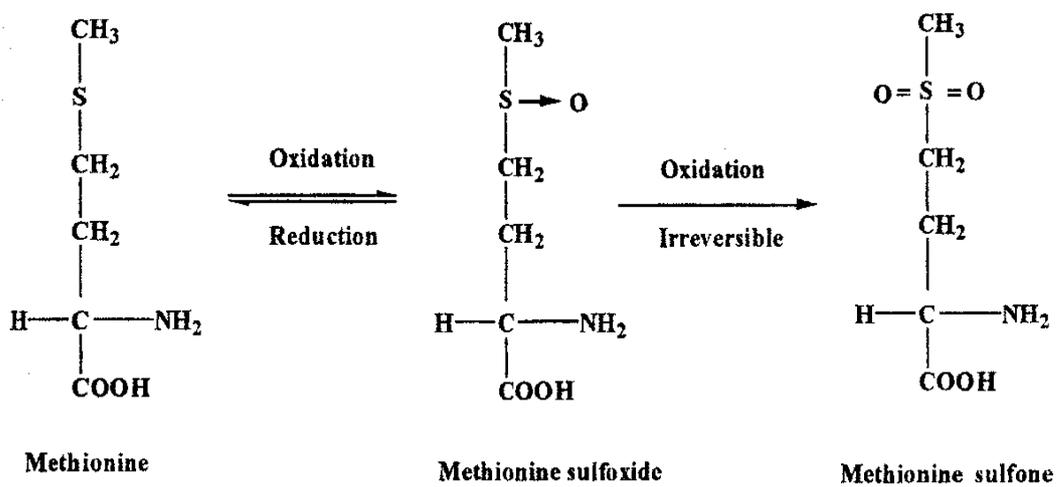
¹The data showed that the Co^{2+} concentration addition for the highest specific activity of wild-type, Asp and His mutant rLAPIIs.

²ND, not determined.



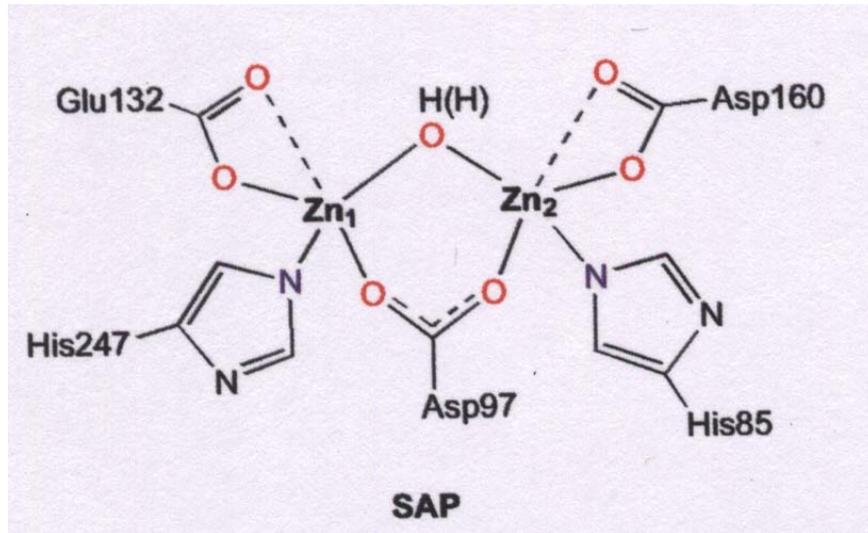
附圖一、Aminopeptidase 參與蛋白水解液去苦味的機制。

Debittering mechanism of protein hydralysate by aminopeptidase.



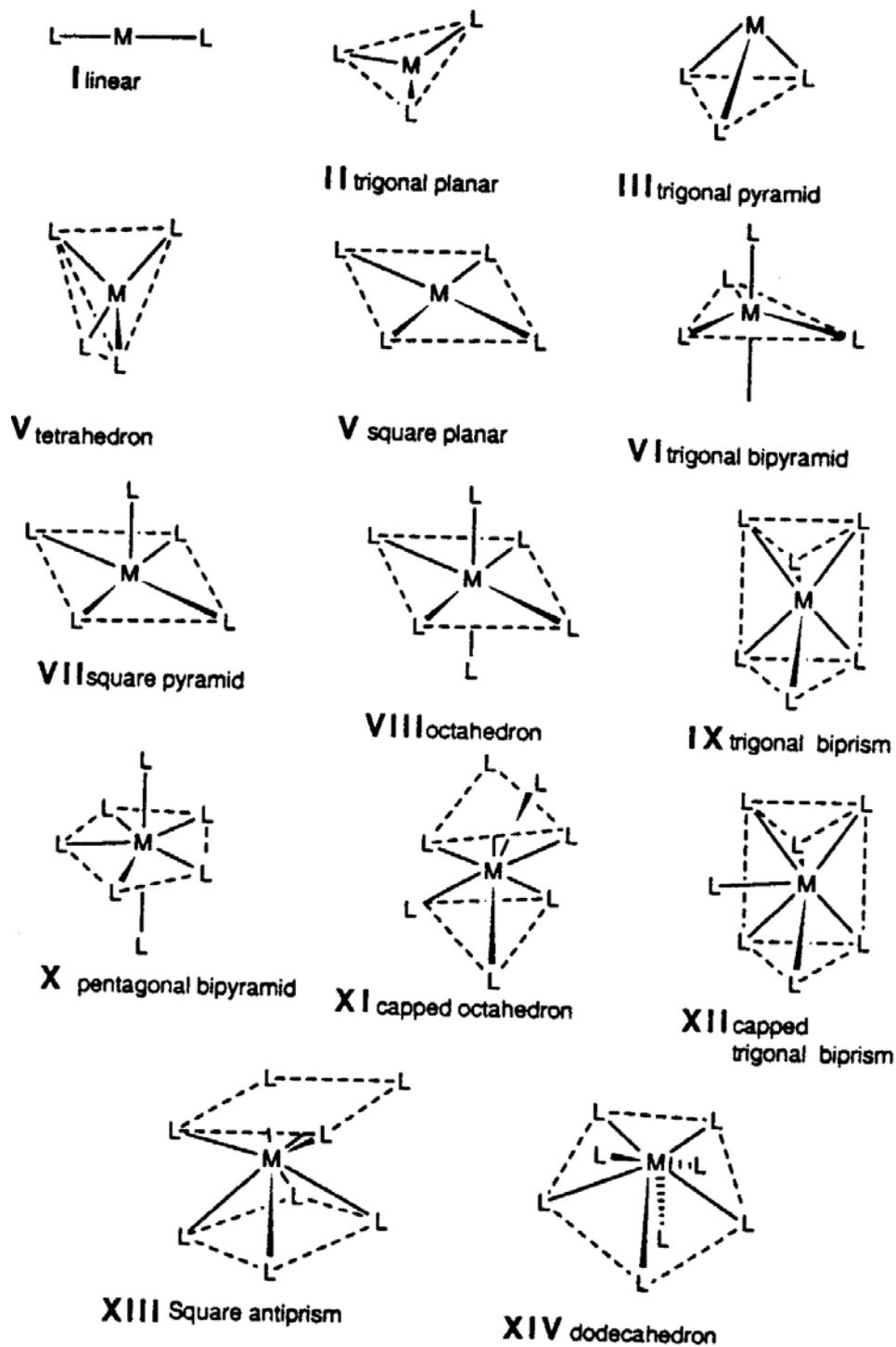
附圖二、Methionine 的結構及其氧化產物。

The structure of methionine and its oxidative products.



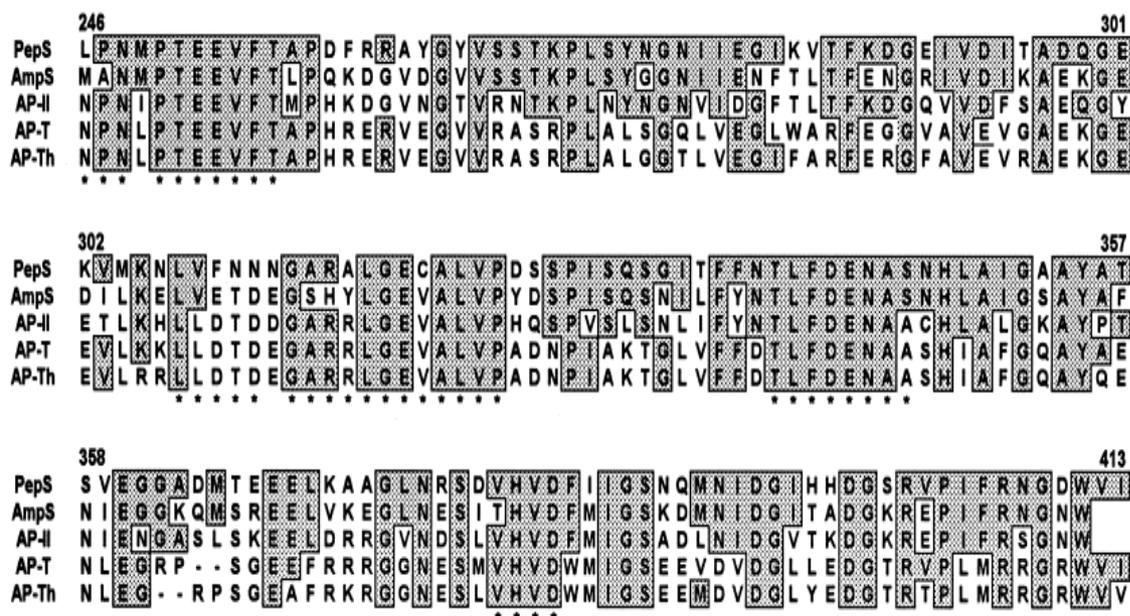
附圖三、*Streptomyces griseus* aminopeptidase 活化中心構造之 X 光結晶解析圖。

Active-site of aminopeptidase from *Streptomyces griseus* based on X-ray crystallography.



附圖四、金屬離子與其配為體鍵結所形成的各種形狀。

Shapes of commonly encountered coordination polyhedra representing ligands (L) and metal ions (M).

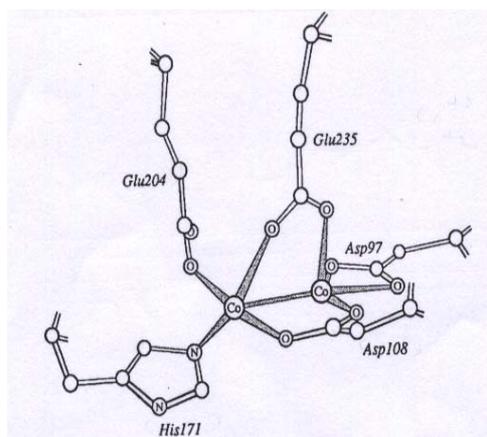


附圖六、AP-T 家族酵素 C 端胺基酸序列之比對。

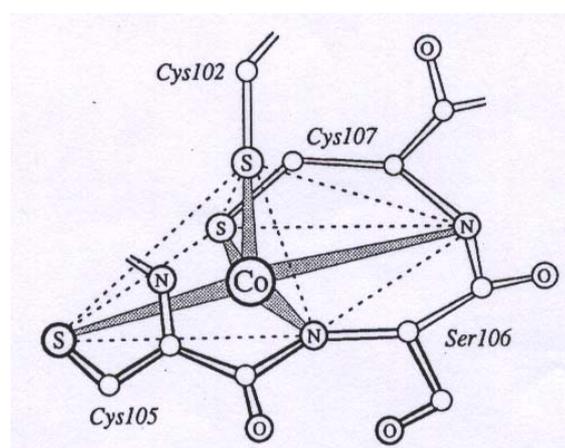
比對來源：PepS 來自 *S. thermophilus*；AmpS 來自 *B. subtilis*；APII 來自 *B. sterarothermophilus*；AP-T 來自 *T. aquaticus*；AP-Th 來自 *T. thermophilus*。保留區以方形框顯示，星狀符號表示具有 AP-T 家族特性的胺基酸殘基。

Multiple alignment of C-terminal amino acid sequences of PepS from *S. thermophilus*, AmpS from *B. subtilis*, APII from *B. sterarothermophilus*, AP-T from *T. aquaticus* and AP-Th from *T. thermophilus*. Conserved regions between PepS and the other aminopeptidases are boxed; asterisks indicate amino acids characteristic of the AP-T family.

(A)

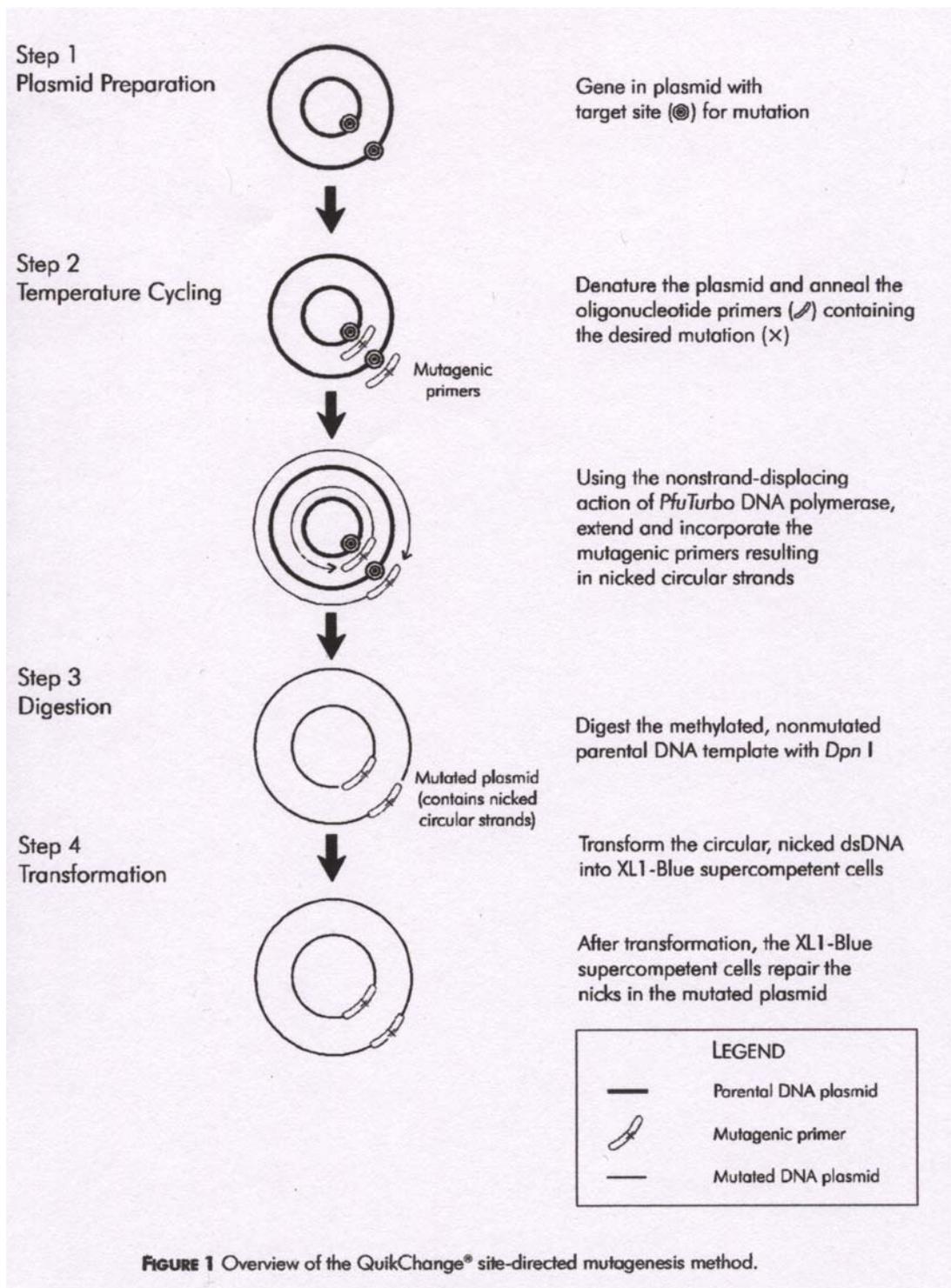


(B)



附圖七、(A) *E. coli* Met AP 及(B) *Rhodococcus* sp. R312 nitrile hydratase 活化中心之胺基酸殘基與 Co^{2+} 離子結合的 X 光結晶解析圖。

Structure of the catalytic metallic core of the *E. coli* methionine aminopeptidase (A) and the nitrile hydratase from *Rhodococcus* sp. R312 (B).



附圖八、QuikChang 定點突變法的流程圖

Overview of the QuikChang site-directed mutagenesis method.

個人資料表

中文姓名：郭莉瑛

英文姓名：Kuo Lih-Ying

出生日期：1960 年 2 月 4 日

出生地：中華民國台灣省豐原市

戶籍地：台中市西屯區福祥街 9 號 5 樓之 1

電子信箱：lykuo@sunrise.hk.edu.tw

學歷：碩士(1984 年 8 月~1986 年 7 月)台灣大學植物學研究所

學士(1979 年 8 月~1984 年 7 月)台灣師範大學生物學系

經歷：講師(1986 年 8 月~1990 年 7 月)輔英護專護理科

教師(1990 年 8 月~1991 年 7 月)台中縣立豐南國中

講師(1991 年 8 月~ 迄今)弘光科技大學食品營養系

論文發表：

1. **Kuo, L.Y.**, Hwang, G.Y., Lai, Y.J., Yang, S.L., and Lin, L.L. (2003). Overexpression, purification, and characterization of the recombinant leucine aminopeptidase II of *Bacillus stearothermophilus*. *Curr. Microbiol.* 47, 40-45.
2. **Kuo, L.Y.**, Hwang, G.Y., Yang, S.L., Hua, Y.W., Chen, W.L., and Lin, L.L. (2004). Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* leucine aminopeptidase II by hydrogen peroxide and site-directed mutagenesis of methionine residues on the enzyme. *The Protein J.* 23, 295-302.

Curriculum vitae

Name : Lih-Ying Kuo

Birth (Date/Month/Year) : 04/02/1960

Address : 5F-1, No. 9, Fwu-Shyang Street, Shi-Twen, Taichung, Taiwan, ROC,
407

E-mail : lykuo@sunrise.hk.edu.tw

Educational background :

Master (9. 1984 ~ 8. 1986), Research institute of Botany, National Taiwan
University

Bachelor (9. 1979 ~ 8. 1984), Department of Biology, National Taiwan Normal
University

Career :

Lecturer (8. 1986 ~ 7. 1990) Fooying Junior College of Medical & Nursing

Teacher (8. 1990 ~ 7. 1991) National Feng-Nan Junior high school

Lecturer (8. 1991 ~) Department of Food and Nutrition, HungKuang
University

Publication :

Kuo, L.Y., Hwang, G.Y., Lai, Y.J., Yang, S.L., and Lin, L.L. (2003).
Overexpression, purification, and characterization of the recombinant leucine
aminopeptidase II of *Bacillus stearothermophilus*. *Curr. Microbiol.* 47,
40-45.

Kuo, L.Y., Hwang, G.Y., Yang, S.L., Hua, Y.W., Chen, W.L., and Lin, L.L.
(2004). Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* leucine aminopeptidase
II by hydrogen peroxide and site-directed mutagenesis of methionine
residues on the enzyme. *The Protein J.* 23, 295-302.