

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

亞硫酸基轉移酵素之反應機制：

酚亞硫酸基轉移酵素之分子模擬、
化學變性與定點突變

計畫類別： 個別型計畫

計畫編號： NSC 89-2113-M-009-009

執行期間： 88年8月1日至89年7月31日

計畫主持人：楊裕雄

執行單位：國立交通大學 生物科技學系

中 華 民 國 89 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

亞硫酸基轉移酵素之反應機制：

酚亞硫酸基轉移酵素之分子模擬、化學變性與定點突變

Mechanism of Sulfuryl Group Transfer: Molecular Modeling, Chemical Modification and Site-Directed Mutagenesis of Phenol Sulfotransferase

計畫編號：NSC 89-2113-M-009-009

執行期限：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：楊裕雄 國立交通大學 生物科技學系

E-mail:ysyang@cc.nctu.edu.tw

計畫參與人員：陳正偉(研究生兼任助理) 國立交通大學 生物科技學系

中文摘要：

本實驗使用類比法 (Homology) 來模擬酚亞硫酸基轉移酵素的蛋白質結構，其骨架則是依據動情激素亞硫酸基轉移酵素 (Estrogen sulfotransferase) 的 X-ray 單晶繞射結構 (1a9u of PDB)。我們可利用模擬出的酚亞硫酸基轉移酵素結構來解釋突變種酚亞硫酸基轉移酵素 (K65ER68G) 的獨特活性，並說明胺基酸 C66, C82 和 C232 之間的相互關係與功能。由結構中我們發現環狀區胺基酸序列區 64~69 是位於受質結合區的開口區附近而且可能作為控制受質進出的活動閘門。經過胺基酸序列的分析以及相關已解出結構的亞硫酸基轉移酵素所提供給我們的資訊皆指出此環狀區是屬於易滑動的。由前人所做的實驗數據以及我們所做的模擬結構中，我們可以說明此環狀區域位於酵素活性區的通路上，對於調控產物的釋出是非常重要的。主要的關鍵在於，C66 和 C82 或是 C66 和 C232 所形成的雙硫鍵能夠固定住此易滑動的環狀區域，並且防止它阻礙到受質的結合或是產物的放出。另外由模擬的結構我們可以發現序列 K65 與 R68 的正電荷對於環狀區與酵素的活性區進出口之間的相互關係也是很重要的。這個發現也可以用來解釋為什麼突變種 (K65ER68G) 酵素只包含 β 型 (無受質 PAP)：此原因為突變後形成的負電荷使得原本可以擋住受質進出口的滑動環狀區遠離，同樣的也可以解釋為何突變種 (K65ER68G) 酵素的生理反應活性可以不需經由氧化就能達到與野生種酵素氧化後得到的活性一樣。

關鍵詞： 硫酸化；核苷酸；亞硫酸基轉移酵素；酵素反應機制。

Abstract

The structure of phenol sulfotransferase (PST) is build by the method of Homology (Insight II) from the crystal structure of estrogen sulfotransferase (1a9u of PDB). The modeled PST structure is used to explain the unique activity of a mutant (K65ER68G) and to elucidate the function of and interaction among C66, C82 and C232. The loop region 64-69 is found outside of the substrate-binding site and may serve as a door of the entrance or exit of the active site. Data analysis of the amino acid sequence and information from known structure of sulfotransferases all indicate that this region is very flexible. From the previous experimental data and our modeling study, we are able to demonstrate that this region is in the way of the enzyme active site and is important for the regulation of the release of products. Formation of disulfide bonds between C66 and C82 or C66 and C232 immobilizes this flexible region and prevents it from hindering substrate binding or product release. The modeled PST structure also shows that positive charges at K65 and R68 are important for the interaction of the loop region with PST active site. This observation explains why only β form (PAP free) of K65ER68G is obtained for the flexible loop region is no longer available as a cover after being mutated to contain a negative charge. The same reason explains the physiological activity of K65ER68G is obtained without oxidation, which is required by wild type PST.

Keywords: Sulfation; Nucleotide; Sulfotransferase; enzyme mechanism; 3'-

Phospho Adenosine 5'-Phosphate (PAP); 3'-Phospho Adenosine 5'-Phosphosulfate (PAPS).

緣由與目的

酚亞硫酸基轉移酵素 (Phenol Sulfotransferase, PST) 或稱 (Aryl Sulfotransferase, AST) (EC 2.8.2.9)。其在人體內的主要功能是將亞硫酸基自 PAPS 催化轉移至酚類的受質上，可使外來的酚類有機物質形成易溶於水的化合物，而有利於將其排出體外，達到解毒的效果，所以我們可將其歸類為解毒酵素。

我們所研究的酚亞硫酸基轉移酵素是由鼠肝中所找到的鼠肝第四型酚亞硫酸基轉移酵素 (PST IV)，我們以轉移反應以及生理反應來表示以及測量此酵素的活性。轉移反應是利用 p-Nitrophenyl sulfate、 β -Naphthol 當反應物，PAP 當輔因子，利用酵素反應所產生的 p-Nitrophenol 來測定酵素的反應活性。^[1]

不過當我們將此酵素之 cDNA 轉錄在大腸桿菌中表達時，我們可發現兩種型式的酵素，分別為 α 型及 β 型，其差別在於 β 型酵素其結構內不包含受質 PAP，而也由於其不含受質 PAP 所以 β 型酵素的三級結構以及穩定性會和 α 型有所不同。^[1] 另外我們所純化出的突變種酚亞硫酸基轉移酵素 (K65ER68G)，其所表達的酵素幾乎全為 β 型酵素，對於突變後所造成的影響也無法解釋。^[1]

本實驗主要為研究酚亞硫酸基轉移酵素因氧化還原產生的結構改變，與受質 PAP 反應的理論模型。我們所推論的模型可由幾點來印證 (1) 1994 年 Duffel 等人利用 ATPDA 「2'-O-[(R)-Formyl(adenin-9-yl)-methyl]-(S)-glyceraldehyde 3'-triphosphate」、 β -ATP dialdehyde 做親和性試驗定出 PAPS 結合位，發現胺基酸序列 63-Leu-Glu-Lys-Cys-Gly-Arg-68 會和 PAPS 類似物 ATPDA 結合，而我們推測此區域可移動靠近 PAPS 與其產生結合^[1]，(2) 利用已知的 Estrogen 亞硫酸基轉移酵素結構 (1997 年 Kakuta 等人解出 X-ray 單晶結構 pdb code: 1aqu)^[2]，我們

用類比法 (Homology) 模擬出酚亞硫酸基轉移酵素的結構，再以結構觀察 PAP 的結合位置發現序列 64-69 的位置並不是位於 PAP 結合區，而是屬於可隨意移動的環狀區 (loop) (可由胺基酸序列分析以及此區域在已解出結構的同家族亞硫酸基轉移酵素也並未能解出的證據推論其為可隨意移動的環狀區)，(3) 經由亞硫酸基轉移酵素家族的胺基酸序列比對我們也可以發現相似度高且經由結晶已確認出的 PAP 結合區中並無包括序列 64~69^[2]，(4) 1996 年 Yang 等人做出突變種 (K65ER68G) 酚亞硫酸基轉移酵素對 PAP 的結合能力較弱，且純化出的酵素全為不含 PAP 的 β 型^[3]，(5) 1997 年 Marshall 等人用質譜法 (Mass spectrometry) 發現酚亞硫酸基轉移酵素中胺基酸 Cys66 氧化或與 Cys232 形成雙硫鍵對酵素的活性扮演著一個相當重要的角色，並且 Cys66 為大多數的亞硫酸基轉移酵素所擁有，屬於保留性的序列 (conserved residue)。

經由以上的證據再加上我們所做的分子模擬我們推論出氧化還原對酵素結構改變的模型，即加入氧化劑 (GSSG) 後將會造成 Cys66 與 Cys232 或 Cys66 與 Cys82 形成雙硫鍵使得原本易滑動的 64~69 的 loop 固定住，這樣 PAP 進出酵素的通道即不被阻礙，我們由轉移反應 (以 PAP 當輔因子，不須放出) 以及生理逆反應 (以 PAP 當受質，須放出才能反應) 可以看出很大的差別，另外突變種 (K65ER68G) 於結構中是因為電荷的改變造成環狀區不易接近酵素的受質進出口區，使的酵素易形成不含 PAP 的 β 型，同樣的也可以解釋為何突變種 (K65ER68G) 酵素的生理反應活性可以不需經由氧化就能達到與野生種酵素氧化後得到的一樣活性。所以藉由本實驗能證明我們所提出的酵素反應理論，也能讓我們更明顯看出受質在酵素內的結合與反應路徑與順序。

結果與討論

本實驗所推論的反應簡圖，可說是經由前人所努力的實驗結果，再加上近年來

同家族的酵素結構紛紛被解出，而我們利用分子模擬的方法，找出重要的胺基酸序列在結構中的相對位置及可能的交互作用，進而推論出氧化後的酵素其實驗結果所帶來的結構上的意義，這可以說是水到渠成所得到的實驗結論，利用分子模擬三維結構所帶來的資訊，我們瞭解了以前一直不明瞭的實驗結果。而且能更清楚的看到受質在酵素內的結合情形，這對研究酵素蛋白質工程或是酵素反應機制的科學家來講可說是相當重要的資訊，他們可以利用此資訊選擇要突變的胺基酸，使酵素的穩定性增高或是改變其受質的特異性，創造出理想或是所謂的超級酵素。以往我們要了解蛋白質結構一定要透過 X-ray 解單晶 或是 NMR 核磁共振光譜才能得到。雖然說分子模擬帶給我們的並不是百分之百的準確結構，但是對於相似度高的酵素(50% 以上)其所做出的酵素結構還是有一定的參考價值，來提供我們做下一步更深入的研究。以我們的酚亞硫酸基轉移酵素來講，我們可以利用分子模擬所做出的結構對不同的 PAP 類似物進行結構上的比對，找尋三度空間中相對應的胺基酸，藉由突變特定區域的胺基酸達到替換受質的目的，相信分子模擬是研究酵素非常好的工具。也期待因為有了參考結構，能使我們的研究更向前邁進一步。

參考文獻

- [1] Zheng Y, Bergold A, and Duffel MW, (1994), Affinity labeling of aryl sulfotransferase IV. Identification of a peptide sequence at the binding site for 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate, *J. Biol. Chem.*, 269: 30313-9.
- [2] Kakuta Y, Pedersen LG, Carter CW, Negishi M, Pedersen LC, (1997), Crystal structure of estrogen sulphotransferase, *Nat. Struct. Biol.*, 4:904-8
- [3] Yang YS, Marshall AD, McPhie P, Guo WX, Xie X, Chen X, Jakoby WB, (1996), Two phenol sulfotransferase species from one cDNA: nature of the differences, *Protein Expr. Purif.*, 8:423-9.
- [4] Marshall AD, Darbyshire JF, Hunter AP, McPhie P, Jakoby WB, (1997), Control of activity through oxidative modification at the conserved residue Cys66 of aryl sulfotransferase IV, *J. Biol. Chem.*, 272:9153-60.
- [5] Chen X, Yang YS, Zheng Y, Martin BM, Duffel MW, Jakoby WB, (1992), Tyrosine-ester sulfotransferase from rat liver: bacterial expression and identification, *Protein Expr. Purif.*, 3:421-6.
- [6] 林恩仕, 1997, 酚亞硫酸基轉移酵素與 Adenosine3',5'-bisphosphate 及其類似物反應之探討, 交通大學生物科技研究所碩士論文。
- [7] 詹淑菁, 1998, 利用 Lys-65 及 Arg-68 定點突變探討酚亞硫酸基轉移酵素與核甘酸結合位置, 交通大學生物科技研究所碩士論文。
- [8] Andrew R. Leach, 1996, MOLECULAR MODELLING PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Addison Wesley Longman Limited.
- [9] DENNIS LIOTTA, 1995, ADVANCES IN MOLECULAR MODELING, Volumn 3.
- [10] 原作者: Gerald M. Maggiora, Lakshmi Narasimhan. 等, 改寫者: 何智雄, 蛋白質分子三維結構預測方法-類此方法 (Homology) 簡介, 國家高速電腦中心, Technical Report.
- [11] 謝昌煥, 解讀生物巨分子結構資料庫 PDB 與 SCOP, 國家高速電腦中心, Technical Report.