

[研究新領域報導]

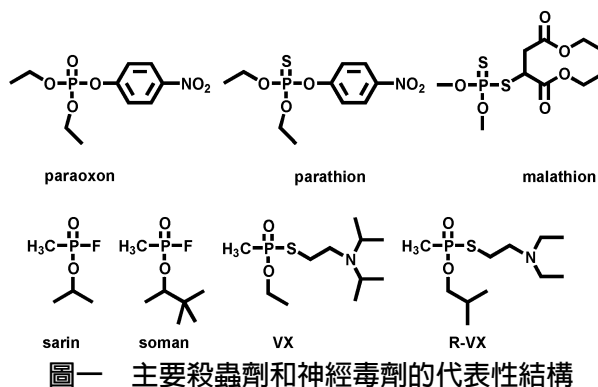
酵素解毒及生物復育

中央研究院化學研究所 李文山

隨著世界人口的快速增加、戰爭和恐怖活動的陰影存在，環境保護和國家安全仍是二項世人所最關切的問題之一。爲了養活更多人，必須在有限的土地上提升農業生產率，結果導致了數百萬噸的殺蟲劑(pesticides)大量使用，而真正用於除蟲效率上卻少於所施灑殺蟲劑總量的百分之一，其餘殺蟲劑卻全數殘留於土壤裏，再次的污染了我們生存的河川及環境，而全世界所使用的殺蟲劑中有百分之七十是有機磷化合物。自從1936年泰奔(tabun)第一次在德國大量製備以來，這些化學武器(chemical warfare)：如沙林(sarin)，梭門(soman)及V系戰劑(VX)都成爲戰爭中和恐怖分子使用的奪命武器，如1988年伊拉克攻擊庫爾德人(Kurdish)事件、1994及1995年日本Matsumot和東京地鐵沙林攻擊及最近的波斯灣戰事(Gulf War)，而這些化學武器也都是有機磷化合物[1-3]。所以，酵素解毒及生物復育法[4-5](enzymatic detoxification & bioremediation)即是利用工程酵素來有效、快速的移除環境中的殺蟲劑或化學武器。討論中將集中在酵素解毒有機磷化合物及最近此研究課題的新發展。

一些常見的有機磷化合物殺蟲劑和神經毒劑的結構如圖一所示，都具有含磷爲中心之化學立體骨架。其對生物體的傷害主要是藉由形成乙醯膽鹼酯酶(acetylcholinesterase)上絲氨酸(serine)的共價鍵錯合物再而抑制乙醯膽鹼酯酶的活性，接而阻礙自主神經傳導系統在於鹼性乙醯膽鹼受體(nicotinic acetylcholine receptors)和毒蕈索性受體(muscarinic receptors)的功能，終而中斷整體神經系統，造成死亡[1]。

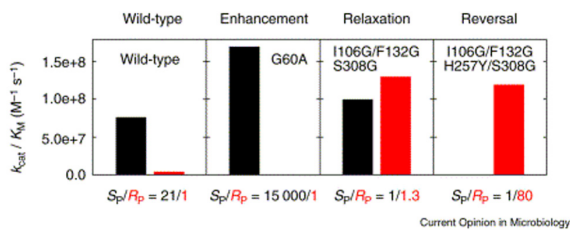
目前分解有機磷化合物的方法主要有化學分解法、焚化法(incineration)及掩埋法(landfills)，但都產生後續大量酸、鹼副產物，釋放有毒廢氣及污染土壤、地下水源等嚴重環保問題[6]。因此利用酵素解毒及生物復育法是現在歐美日各國極熱門、重視且具生物高科技的綠色化學(green



圖一 主要殺蟲劑和神經毒劑的代表性結構

chemistry)，也兼具安全、方便和經濟的一種方法。但是如何尋覓新酵素能有效率催化分解所需要特定的毒化物是當前最大的挑戰。目前已知具有能力分解有機磷化合物的酵素有：磷三酯酵素(phosphotriesterase)、有機磷酸酐水解酶(organophosphorus acid anhydrolase)、對氧磷酯酶(paraoxonase)、DFP 水解酶(DFPase)、大腸桿菌脯氨酸肽酶(*E. coli* prolidase)和氨基肽酶 P (aminopeptidase P)，其中以磷三酯酵素的催化解毒效果最好且應用最廣泛。

自1989年來Raushel報導了詳盡有關磷三酯酵素的X-ray結構、功用及其解毒和生物復育上的應用[7]；磷三酯酵素是來自細菌體的雙鋅有機金屬酶，其分解之受質(substrate)相當多樣性，可以切斷P-O，P-F，P-S及P-CN鍵，其中對於P-O鍵的分解速率最快，例如：其水解paraoxon的速率可達到 $k_{cat} \sim 3000 \text{ s}^{-1}$ 且 k_{cat}/K_m 值爲 $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。反應機制是利用二個鋅金屬活化水分子產生具親核能力的氫氧基(OH⁻)以攻擊磷原子中心，由動力學標示實驗驗證水解後產物具有反轉(inversion)立體結構。爲了研究磷三酯酵素對受質異構物(R/S isomers)的立體選擇性，針對酵素活化中心胺基酸作合理的定點突變(site-directed mutagenesis)方式來改變活化中心的三個結合囊袋(binding pocket)大小，而成功的達到使原來磷三酯酵素對於受質異構物有增強

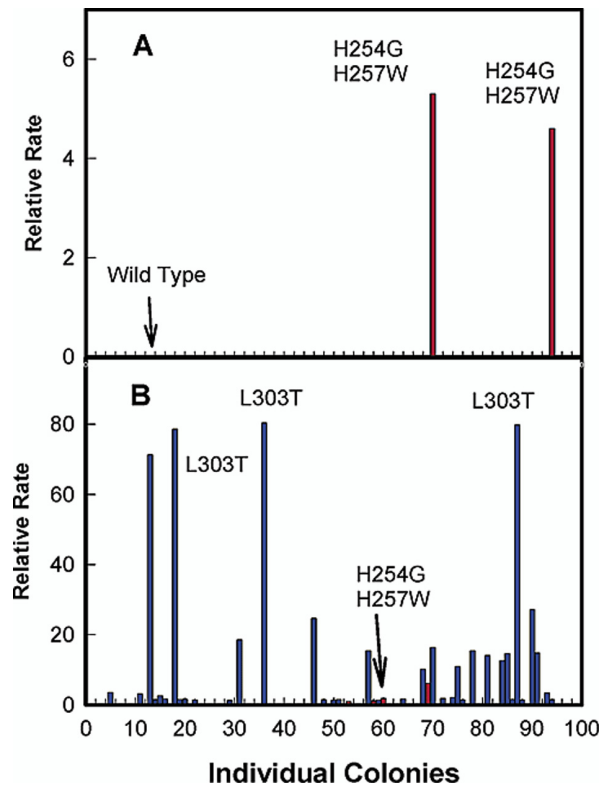


圖二 突變磷三酯酵素對受質立體結構選擇性改變。圖摘自 Curr. Opin. Microbiol. 5, 288 (2002)

(enhancement)、緩衝(relaxation)及逆轉(reversal)其立體喜愛性的效果[7-8]，例如圖二所示，磷三酯酵素催化個別鏡像有機磷化物顯示 S_p/R_p 比例由原先(wild type)之 21:1 增強到 15000:1(當 G60A 突變蛋白催化時)，若使用 I106G/F132G/S308G 則得到緩衝狀態之 1:1.3 立體選擇，再利用 I106G/F132G/H257Y/S308G 催化可得完全逆轉受質立體結構的選擇結果 1:80，而此結果代表接近 10^6 的立體結構選擇性變化，可歸功於合理定點突變方法作效，而且部份突變磷三酯酵素分解有機磷化物之速率更可達到擴散極限(diffusion-controlled limit)。

另外利用定向演化(directed evolution)方法，針對磷三酯酵素活化中心的胺基酸作任意突變方式來水解 S_pS_c -梭門類似物[9]，發現 H254X/H257X 這組突變蛋白質內有二個菌落(colonies)顯示較好的水解能力且都有相同的突變 H254G/H257W 如圖三(A)所示；再由 H254G/H257W 作為基礎，一系列菌落掃描得到其中一株含 H254G/H257W/L303X 有最好的解毒能力，進一步的任意突變得到當 L303→L303T 時 H254G/H257W/L303T 有將近 10^3 倍增強水解活性能力(k_{cat}/K_m)，這也是目前對分解 S_pS_c -梭門類似物最好的突變磷三酯酵素，圖三(B)。

因磷三酯酵素具有成為解毒及生物復育法中酵素的要件(高催化性 $k_{cat}>100/\text{min}$ 、不需要輔助因子(cofactor)、穩定度好、適應環境能力強、可水解多樣性受質和容易量產)，已被廣泛利用固定化方式[6]來分解環境中的有機磷毒化物且解毒效果持續達到 19 天之久[10]；除此之外磷三酯酵素亦有醫療酵素之條件(具生物體內活性、容易純化及具有最少的免疫反應和多效作用 pleiotropic effect)，經測試生物體內保護作用時間可達 60 分[11]；由於其對神經毒劑(沙林、梭門

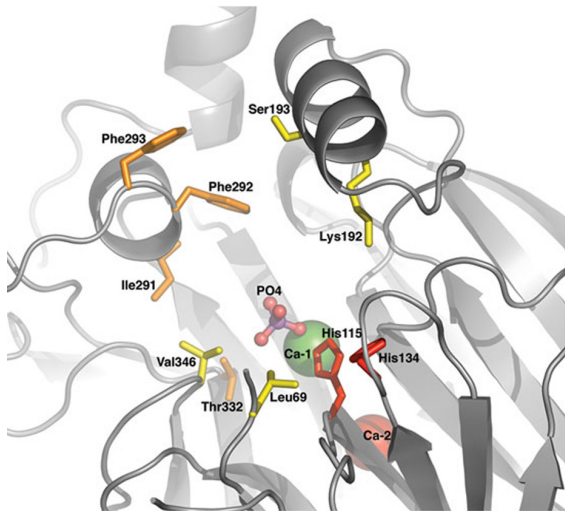


圖三 利用定向演化掃描磷三酯酵素對 S_pS_c -梭門類似物水解能力。圖摘自 J. Am. Chem. Soc. 125, 8990 (2003)

和 VX)及其類似物之解毒效果和選擇性都優於目前大部份的酵素，更多的研究集中在應用磷三酯酵素於醫療及防毒面具材質上。

有機磷酸酐水解酶的 3D 結構尚未清楚，但已被應用在有機磷化物 P-O 及 P-F 鍵的水解和軍事上沙林、梭門解毒(比 wild type 磷三酯酵素水解能力強)研究[7]，研究沙林類似物顯示有機磷酸酐水解酶對 R_p 受質分解力較好， k_{cat}/K_m 值分別為 $250 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (R_p)和 $110 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (S_p)。而對於梭門類似物(R_pR_c , R_pS_c , S_pR_c , S_pS_c)則有下列受質傾向選擇性: $R_pS_c > R_pR_c > S_pR_c > S_pS_c$, k_{cat}/K_m 值分別為 $36,300 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $1250 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $80 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，所以有機磷酸酐水解酶對 R_pS_c 水解能力是 S_pS_c 的 7000 倍[12]。但是對於含 P-S 鍵之化合物(VX 和 R-VX)卻無分解能力。

對氧磷酯酶在自然界生物體內都有，如哺乳類、脊椎動物和無脊椎動物[13]。對氧磷酯酶具有多類同功異構酶(isozymes)可以分解 P-C, P-O, P-F 及 P-CN 鍵之有機磷，且由“對氧磷酯酶基因剔除”的小鼠實驗上證實較易受到有機磷化物之毒害，顯示此酵素具有保護生物體的潛力



圖四 由定向演化法找出對氧磷酯酶中幾個增強磷三酯酶活性的胺基酸(黃色)。圖摘自 *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 412 (2004)

[14]。最近 Sussman 也利用定向演化法在血清對氧磷酯酶中找到幾個重要的胺基酸：Ser193，Lys192，Leu69 和 Val346 (圖四，黃色部份胺基酸)，若突變上述胺基酸可增強對氧磷酯酶的磷三酯酶活性[15]。而這些突變蛋白質其水解 paraoxon 之速率約 k_{cat} 0.0008 ~ 1.2 s^{-1} 而 k_{cat}/K_m 值為 0.73 ~ $1 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$ [16]。

DFP 水解酶來自於墨魚，其 X-ray 結構最近也已解出，它具有切斷 P-F 鍵化合物的能力如沙林和梭門[17]，但是卻無法水解含 P-C、P-O、P-S 和 P-CN 鍵之有機磷化合物。很明顯地，墨魚的 DFP 水解酶具沙林和梭門的解毒功能並非演化而來，因為那個時候神經毒劑尚未被發展出來。而實驗發現 DFP 水解酶分解 DFP(diisopropyl fluorophosphate)的能力約是水解梭門的 2 ~ 20 倍[18]。

大腸桿菌脯氨酸胺酶和其它脯氨酸胺酶(交互單胞菌屬 *alteromonas*)都是水解含脯氨酸基蛋白質的碳端胜肽鍵，它和有機磷酸酐水解酶在胺基酸序列上有 50%同源相似度，因此被認為它應該也有水解有機磷化合物的能力。最近實驗上證明大腸桿菌脯氨酸胺酶的確有效的分解殺蟲劑類的磷化合物(但原作者已收回此發表)，而且對沙林及梭門類似化合物亦有水解效果，其 k_{cat} 介於 0.01 ~ 134 min^{-1} 之間而 k_{cat}/K_m 值約為 0.07 ~ 707 $M^{-1}s^{-1}$ 。更有趣的是大腸桿菌脯氨酸胺酶分解 P-F 鍵之速率比分解 P-O 類似物來得快，例如水解

DFP 之 k_{cat} 590 min^{-1} 而 k_{cat}/K_m 值為 250 $M^{-1}s^{-1}$ ，其 k_{cat}/K_m 值約為同類型 P-O 類似物(diisopropyl *p*-nitrophenyl phosphate)的 150 倍高[19]。另外來自於交互單胞菌屬之脯氨酸胺酶亦具有水解化學武器及其類似物的能力，其 k_{cat} 值分佈在 85 ~ 2496 s^{-1} 之間[20]。

大腸桿菌胺基胺酶 P 是水解含脯氨酸基蛋白質的氮端胜肽鍵，它和有機磷酸酐水解酶在胺基酸序列上也有 30%同源相似度。這一酵素最近亦被報導具水解酶能力，可以分解殺蟲劑有機磷化合物如有機三烷基磷化合物，反應速率介於 3 ~ 15 $nmol/min$ 之間[21]。且經由定點突變方法亦找出部份胺基酸突變可增強沙林類以物的解毒效果(結果尚未發表)。

為了解決這些酵素在生物體內較短的半衰期，利用早期單株抗體有效結合外來毒素達到醫療效果的方式最近也被應用來解毒神經戰劑，結果顯示單株抗體-PAR15 可以水解 VX 類似物，分解能力約為 0.36 $M^{-1}min^{-1}$ ，這證實利用醫療催化抗體可以用來醫治神經毒劑中毒病患[22]。

因為環境保護和國家安全意識的高漲，利用酵素解毒及生物復育的方法來達到分解有害毒化物，恢復綠意盎然的大地並具醫療效果，已是先進國家追求的目標；但是如何發現嶄新的酵素或利用生物工程方法創新酵素功能以達到解毒及生物復育要求，是目前所遭遇的瓶頸，由於基因體學與蛋白質體學科技的蓬勃發展，勢必將提供另一個全新的研究模式。

參考文獻

- [1] H. Okudera, *J. Clin. Neurosci.*, **9**, 17 (2002).
- [2] A. W. Abu-Qare and M. B. Abou-Donia, *Food Chem. Toxicol.*, **40**, 1327 (2002).
- [3] J. P. Fitch *et al.*, *Science*, **302**, 1350 (2003).
- [4] D. H. Pieper and W. Reineke, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **11**, 262 (2000).
- [5] T. D. Sutherland *et al.*, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **31**, 817 (2004).
- [6] R. D. Richins *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **15**, 984 (1997).
- [7] F. M. Raushel, *Curr. Opin. Microbiol.*, **5**, 288 (2002).
- [8] M. Chen-Goodspeed *et al.*, *Biochemistry*, **40**,

- 1332 (2001).
- [9] C. M. Hill *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8990 (2003).
- [10] A. Mulchandani *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, **63**, 216 (1999).
- [11] I. Petrikovics *et al.*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **156**, 56 (1999).
- [12] C. M. Hill *et al.* *Bioorg. Chem.*, **29**, 27 (2001).
- [13] H. G. Davies *et al.*, *Nat. Genet.*, **14**, 334 (1996).
- [14] D. M. Shih *et al.*, *Nature*, **394**, 284 (1998).
- [15] M. Harel *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 412 (2004).
- [16] A. Aharoni *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 482 (2004).
- [17] F. C. G. Hoskin and A. H. Roush, *Science*, **215**, 1255 (1982).
- [18] J. Koepke *et al.*, *Acta Cryst.*, **D58**, 1757 (2002).
- [19] M. -S. Park *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **429**, 224 (2004).
- [20] T. -C. Cheng *et al.*, *Chem.-Biol. Interact.*, **119-120**, 455 (1999).
- [21] S. -C. Jao *et al.*, *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **27**, 7 (2004).
- [22] P. Vayron *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 7058 (2000).