

2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	080011
參展科別	生物化學
作品名稱	微生物源之甜菜素合成酵素的結構功能探討與 潛在應用
得獎獎項	一等獎

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 許名智、徐駿森

作者姓名 鄭秀中、廖禹晴

關鍵詞 4,5-多巴雙加氧酶、蛋白質工程、甜菜素合成

作者簡介



大家好，我們是廖禹晴(左)、鄭秀中(右)，目前就讀北一女中數理資優班。因緣際會下選擇化學組，一年的專題過程中遇到許多困難，也因此使我們逐漸成長，更加投入於研究主題中。

在研究過程中，感謝大學端教授不吝提供資源與建議，在這一年內不間斷支持、幫助我們的專研老師，以及陪伴我們進行、講解許多實驗技術與知識的學長。因為他們的協助，我們才有機會來到國際科展，透過與他人交流拓展我們的視野。

摘要

甜菜黃素為植物內水溶性色素，以植物 4,5-多巴雙加氧酶催化 L-多巴形成甜菜醛胺酸，再與胺基化合物可得到甜菜素。甜菜素極佳的抗氧化性被認為可發展有效的抗癌保健。

目前甜菜素由植物萃取與植物酵素合成，近期研究發現某些微生物有可催化 L-多巴轉換機制的 4,5-多巴雙加氧酶，但資訊未完備。又偵測 L-多巴可診斷初期帕金森氏症，此酵素的催化機制可檢測 L-多巴。

本研究探索微生物源 4,5-多巴雙加氧酶，經基因體探勘、基因選殖與蛋白表現後，將重組蛋白純化並探討結構與功能。目前已進行活性測試、得到蛋白最佳反應環境，並分析兩種蛋白質結構，比較兩種蛋白結構與活性之關聯性；以及進行酵素動力學實驗。亦已開始著手應用層面，成功設計並合成出雙加氧酶與酪胺酸酶之引子。

未來期待以結構資訊改良酵素；應用面用於測定醫療之 L-DOPA，加入酪胺酸酶於細菌大量生產甜菜素。

Abstract

Betaxanthin is a water-soluble pigment in plants belonging to the betaine. In-plant, L-DOPA is dioxygenated to form betalamic acid by plant 4,5-DOPA-extradiol-dioxygenase(DOD) and reacted with amine compounds to obtain Schiff base product, betaxanthin. Due to the outstanding antioxidant activity of betaxanthin, it could potentially develop an effective anti-cancer drug. In addition, L-DOPA is the early-stage drug for Parkinson's disease. The apparent color change from L-DOPA to betalamic acid could be a useful phenomenon to monitor L-DOPA concentration in blood.

At present, the preparation of betaine could be two ways, extract from plant or synthesize by plant enzymes. However, recent studies have found that some microorganisms have DOD that can catalyze the L-DOPA dioxygenation reaction, but the information is not yet completable.

In this study, we explored microbial-derived DOD by genomic analysis, expressed and purified the recombinant protein. In addition, we solved two crystal structures of DOD and compared the difference between both. We characterized the activity of DOD by monitoring the absorption of the reaction product and obtained the optimal reaction environment for the protein. In addition, we start to clone the

DOD gene and tyrosinase gene to one vector and expect to obtain the betaxanthin product after inducing the co-expression of two enzymes.

In the future, we expect to improve the enzyme activities by protein engineering based on structural information. In application, we will use DOD to determine unknown L-DOPA concentrations in solutions. Also, we will complete the cloning vector for co-expressing DOD and tyrosinase and try to obtain the betaxanthin product from bacteria hosts.

壹、前言

一、研究背景介紹

(一)甜菜色素與 4,5-多巴雙加氧酶

甜菜色素為存在於植物體內之水溶性色素。在先前的文獻指出，甜菜色素對於植物花朵的呈色、紋路扮演重要的角色¹。甜菜色素依其化合物構造可分為兩類，分別為甜菜醛胺酸(betalamic acid)與胺類(amines)化合物形成之甜菜黃素(betaxanthin)，或與環多巴(cyclodihydroxyphenylalanine, cyclo-DOPA)形成之甜菜紅素(betacyanin)。然而，無論甜菜黃素抑或是甜菜紅素，均以甜菜醛胺酸做為合成甜菜色素之前驅物。

4,5-多巴雙加氧酶(4,5-DOPA-extradiol-dioxygenase，簡稱 DOD)為一種可催化 L-多巴(levodopa, L-DOPA)形成甜菜醛胺酸之酵素。此酵素會於 L-多巴之 4、5 號碳上各接一個氧原子、形成兩個碳氧雙鍵，並催化苯環開環反應。該產物會經由自發性的環化反應形成甜菜醛胺酸。而甜菜醛胺酸再與胺類化合物結合形成希夫鹼(Schiff base)之構造，得到甜菜黃素^{2,3}(圖 1)。

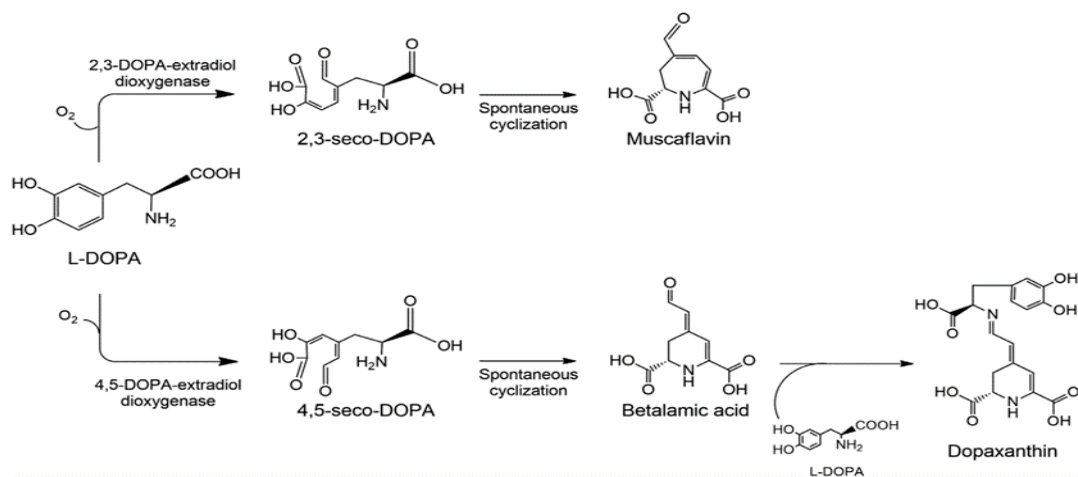


圖 1. DOPA 4,5-雙加氧酶與 L-多巴合成甜菜黃素³

(二) L-多巴作為帕金森氏症之初期藥物

帕金森氏症為一神經退化疾病，臨床上使用 L-多巴作為延緩症狀之初期藥物^{4,5}。為了監測病患投藥之狀況，會定期檢測病患血液中 L-多巴之濃度，以確保此藥物之療效。而 L-多巴恰巧為 4,5-多巴雙加氧酶反應之受質，其快速反應、並具明顯呈色變化的特性，具有做為檢測 L-多巴濃度之潛力。因此本研究以 4,5-多巴雙加氧酶為基礎，探討其結構與功能，盼能透過蛋白質工程之技術，提升酵素活性，並用於臨床上 L-多巴濃度之檢測。

(三) 微生物源之 4,5-多巴雙加氧酶

先前文獻指出，微生物中存在具有 4,5-多巴雙加氧酶功能之蛋白質^{2,3,6,7}。且此酵素在不同種類的微生物中有極大的分子量差異。但在微生物的生理功能上，並不需自行製造甜菜素，故文獻預測此類型的酵素應是參與微生物降解苯環類化合物之反應。

二、研究動機

甜菜素為一種水溶性植物色素，但相比於胡蘿蔔素與花青素，較顯為人知。然而其抗氧化效果不亞於花青素，亦可降低罹癌風險，達到保健身體的功效。⁸甜菜素一般因呈色需要，僅於植物體內生產；然而，於文獻中顯示少數微生物亦具有 4,5-多巴雙加氧酶，雖於細菌內的功能可能與降解芳香環物質有關，但也可利用類似機催化生產甜菜素之先驅物—甜菜醛胺酸。由於微生物源之 4,5-多巴雙加氧酶與植物之酵素序列相似度低，意味著有著截然不同的蛋白質構型，但為何仍有相近的酵素催化能力，從化學機制上尚未有完整解釋。

因此我們希望利用微生物基因體探勘，找出具有研究潛力之微生物源 4,5-多巴雙加氧酶，盼能提供此類型之酵素更進一步結構與功能的資訊，並希冀透過蛋白質工程之技術、提升 4,5-多巴雙加氧酶之催化效率。此酵素並可近一步用於臨床上檢測血液中 L-多巴之濃度；最後，期望未來可透過合成生物學的方式，將 4,5-多巴雙加氧酶與可催化產生多巴之酪胺酸酶整合利用，以達成於微生物體內生產甜菜素之目的。

三、研究目的及研究問題

- (一) 針對微生物源基因體進行多物種同源基因之鑑定和篩選。
- (二) 以篩選結果之微生物源基因做基因選殖，取得重組蛋白。
- (三) 比較二種不同微生物源蛋白之酵素反應機制、活性、功能。
- (四) 臨床檢測血液中 L-多巴濃度。
- (五) 結合運用酪胺酸酶，微生物體生產甜菜素。

貳、研究方法過程

一、 研究設備與器材

- (一) DNA 膠體螢光影像分析
- (二) 聚丙烯醯胺膠體電泳(SDS-PAGE)
- (三) 快速蛋白液相色譜
- (四) 分光光譜儀
- (五) 水浴槽
- (六) 離心機
- (七) 移液器(Pipetman p10, p20, p100, p1000)
- (八) 試管振盪器
- (九) 微生物培養箱
- (十) 低溫冷凍櫃
- (十一) 滅菌釜
- (十二) 乾浴槽
- (十三) 晶體培養盤
- (十四) 96 微量多孔盤

二、 研究過程

利用基因體探勘的技術，挑選出具開發潛力之蛋白質標的，進行蛋白質的功能與生化特性分析，並透過蛋白質工程的改良，比較二種不同微生物源蛋白，提高酵素之穩定及應用性。



三、實驗步驟

(一)NCBI 基因序列探勘

(二)基因選殖、質體轉型

1. 以微生物之基因組 DNA 作為模板
2. 設計引子
3. 利用聚合酶鏈鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)將此段基因序列放大
 - (1) 將其置於 95°C下變性 30 秒。
 - (2) 在 55°C降溫 30 秒。
 - (3) 使其在 72°C下擴大 1 分 30 秒。
 - (4) 步驟(1)~(3)循環 30 次。
4. 將放大後的產物接合到 vector pET30a 中，形成質體
5. 透過 DNA 定序檢查選殖所得的基因序列
6. 將質體轉型至勝任細胞中
 - (1) 將 50 μ L 勝任細胞與 1 μ L 質體混合。
 - (2) heat shock 90 秒使質體進入細胞。
 - (3) 加入液態培養基，放置 37°C恆溫箱培養 30 分鐘。
 - (4) 塗盤，放置 37°C恆溫箱 16 小時後以 4°C保存。

(三)蛋白質異源表現測試

1. 於菌盤挑選單一菌落，與 5mL LB 混和(含 5 μ L 抗生素)
2. 放置轉速 170rpm、37°C恆溫箱，至 OD₆₀₀=0.4~0.6
3. 二種菌液各分為兩管：一管加 1mM 異丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside, 下簡稱 IPTG)，另一作為控制組則否
4. 放置恆溫箱中，以轉速 120rpm、25°C誘導 16 小時
5. 各管取 2mL 菌液，離心分離上清液與菌塊
6. 將菌塊加入 50 μ L B-PER 回溶，並於冰上放置 15 分鐘
7. 以 13000rpm 離心 5 分鐘，分離上清液及沉澱

8. 跑膠：分別將同一種蛋白中，控制組與實驗組之上清液、沉澱進行跑膠，確認蛋白表現狀況

(四)蛋白質純化

1. 破菌

- (1) 挑選單一菌落，接於內含 50 μ g/mL 抗生素 Kanamycin 之 LB 液態培養基中，放置 37 $^{\circ}$ C 恆溫箱培養 16 小時。
- (2) 每 25mL 菌液加至 1L 已滅菌且內含相同濃度、種類抗生素之 LB 中，放置於 37 $^{\circ}$ C、轉速 170rpm 至 OD₆₀₀=0.4~0.6。
- (3) 加入 1mM IPTG，於 25 $^{\circ}$ C、轉速 120rpm 中放置過夜。
- (4) 於 4 $^{\circ}$ C、轉速 6000rpm 下離心 10 分鐘。
- (5) 每 1L 培養出之菌塊以 15mL lysis buffer(20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8.0) 回溶並加入 PMSF 使其最終濃度為 1mM，利用超音波破菌機破菌 30 分鐘。
- (6) 留下 20 μ L 原液進行後續跑膠步驟。剩餘液體以 4 $^{\circ}$ C、轉速 13000rpm 離心 20 分鐘並取上清液。

2. 蛋白質純化

- (1) 上清液以 0.45 μ m filter 過濾。
- (2) 將上清液通入 Ni-NTA column 並收集液體(後標示為 flow through)。
- (3) 將體積分別為 50mL、25mL、12.5mL、12.5mL、12.5mL、12.5mL 之 20mM、40mM、60mM、100mM、250mM、500mM 之 imidazole buffer 依序加入管柱中，收集液體。
- (4) 進行 SDS 蛋白質膠體電泳分析，得知含有蛋白之溶液。

3. 蛋白質透析、濃縮

- (1) 將含有蛋白之溶液加入透析袋中，並使用不含 Imidazole、且 NaCl 濃度調整為 100mM 之透析液，透析 3 次(其中一次過夜透析)。
- (2) 透析後之蛋白液加至孔徑分子量大小為 10K 之濃縮管，於轉速 4000g 下離心。
- (3) 重複步驟(2)直到加完溶液、濃縮至數毫升內。

(五)蛋白質濃度測定

1. 分光光譜儀

- (1) 取兩個 cuvette 以水清洗三次，加入 buffer 後將分光光譜儀吸光值歸零。
- (2) 取出一管 cuvette 中的 buffer，加入稀釋後蛋白質(稀釋倍數依蛋白而定，例：IIDOD 稀釋 50 倍)。
- (3) 以分光光譜儀測出蛋白質在 UV₂₈₀ 下的吸光值。
- (4) 比爾定律換算蛋白質濃度。

(六)蛋白質活性分析

1. 酵素於最佳酸鹼值活性測試

- (1) 配製醋酸鈉(sodium acetate)緩衝溶液(pH=3.5~6.0)、磷酸鈉(sodium phosphate)緩衝溶液(pH=5.5~8.5)。
- (2) 依序於 96 微量多孔盤中加入藥品(每個實驗均三重複)：

名稱	原先濃度	溶液中濃度	
緩衝溶液	100mM	25mM	} 順序不拘
三氯化鐵(aq)	5mM	0.5mM	
sodium ascorbate	100mM	10mM	
蛋白質	測定	0.25mg/mL	
L-DOPA	10mM	2.5mM	→ 最後加入

- (3) L-DOPA 加入後反應 10 分鐘，離心抽出上清液。
- (4) 分光光譜儀測量吸光值(OD₄₁₄)。
- (5) 繪圖比較不同酸鹼值下多巴雙加氧酶相對活性。

2. 酵素最佳溫度活性測試

- (1) 實驗溫度 25~60°C，間隔 5°C。
- (2) 依序加入藥品(每個實驗均三重複)，於乾浴槽中控溫操作。L-DOPA 達到預定溫度後再與其他溶液混合。L-DOPA 加入後，反應 10 分鐘。

名稱	原先濃度	溶液中濃度	
磷酸鈉緩衝溶液(pH=7.0)	100mM	25mM	} 順序不拘
三氯化鐵(aq)	5mM	0.5mM	
sodium ascorbate	100mM	10mM	
蛋白質	測定	0.25mg/mL	
L-DOPA	10mM	2.5mM	→ 最後加入

- (3) 分光光譜儀測量吸光值(OD₄₁₄)。

(4) 繪圖比較不同溫度下多巴雙加氧酶相對活性。

(七)蛋白質結構解析

1. 蛋白質晶體培養
2. 數據收集與分析
3. 蛋白質晶體結構
4. 受質結合位與預測 L-DOPA 分子結合方式

(八)酵素動力學

1. 利用序列稀釋調配 L-DOPA 濃度，不斷將 L-DOPA 稀釋 1/2 倍，反應濃度為 5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078125、0.0390625mM，共 8 種。
2. 依序於 96 微量多孔盤中加入藥品(每個實驗均三重複)：

名稱	原先濃度	溶液中濃度	
磷酸鈉緩衝溶液(pH=7.0)	100mM	25mM	} 順序不拘
三氯化鐵(aq)	5mM	0.5mM	
sodium ascorbate	100mM	10mM	
蛋白質	測定	0.25mg/mL	
L-DOPA	10mM	5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078125、0.0390625、0mM	→ 最後加入

3. L-DOPA 加入後立即測量吸光值(OD₄₁₄)30 秒/次，共 10 分鐘。
4. 繪圖並比較各濃度 L-DOPA 下的反應初速率，並繪製 Michaelis-Menten 酵素動力學圖形，得到酵素的動力學參數。

(九)4,5-多巴雙加氧酶與酪胺酸酶結合

1. 設計引子
 - (1) 透過 IIDOD 與酪胺酸酶蛋白質序列及載體資訊，決定切位。
 - (2) 加上終止密碼子與 DNA 序列，並保留鹼基對供酵素坐落。
 - (3) 交由生技公司合成。
2. 利用聚合酶鏈鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)將此段基因序列放大
3. 進行瓊脂糖凝膠電泳 (agarose gel electrophoresis) 確認 PCR 過程正確

參、研究結果與討論

一、NCBI 基因序列探勘

- (一)從生物資料庫(NCBI)，對微生物源多巴雙加氧酶基因進行分析，挑選出木質醋酸菌(*Komagataeibacter xylinus*)多巴雙加氧酶、以及黏泥異地菌(*Inquilingus limosus*)多巴雙加氧酶進行比較。
- (二)將前述挑選出之酵素與先前已解析之 4,5-多巴雙加氧酶進行蛋白質氨基酸序列比對，分別選用 WP_012222467.1(重氮葡糖醋桿菌, *Gluconacetobacter diazotrophicus*)、6ON3_F(硬化鏈黴菌, *Streptomyces sclerotialis*)、2PW6_A(大腸桿菌 K12 菌株, *Escherichia coli* K12)，於 Clustal Omega 進行蛋白質一級序列分析，各蛋白序列相似度如表 1 所示。

表 1. DOPA 4,5-雙加氧酶之蛋白質序列相似度比對

	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	<i>Inquilingus limosus</i>	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	<i>Streptomyces sclerotialis</i>	<i>Escherichia coli</i> K12
<i>Komagataeibacter xylinus</i>	100	61.59	61.27	18.48	15.38
<i>Inquilingus limosus</i>		100	56.52	22.22	15.38
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>			100	19.57	17.28
<i>Streptomyces sclerotialis</i>				100	24.00
<i>Escherichia coli</i> K12					100

二、基因選殖、質體轉型

將 KxDOD、IIDOD 的基因片段序列交由生技公司合成，後續將此基因片段接至 pET30a 載體，並轉形入 *E. coli* 進行表現。

三、蛋白質異源表現測試

分別於轉形入 KxDOD、IIDOD 質體之 *E. coli* 菌液加入 1mM 誘導物 IPTG、於 25°C 進行培養，確認蛋白質表現狀況(圖 2、圖 3)。

註：實驗室本身購買的勝任細胞，該菌株類型特性上在培養一段時間後，即使無 IPTG 的添加，仍有部分的重組蛋白會被製造。

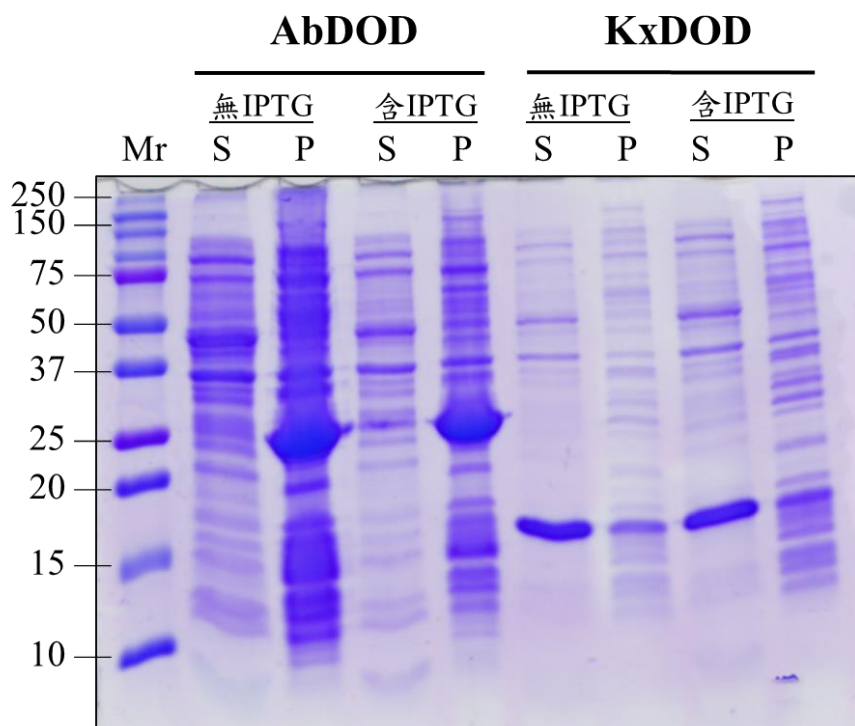


圖 2. 15%SDS-PAGE AbDOD、KxDOD 小量蛋白質表現測試圖

分別將 AbDOD、KxDOD 於 *E. coli* BL21 中進行小量誘導後，破菌所得蛋白質結果。Mr: marker, S:supernatant, P:pellet

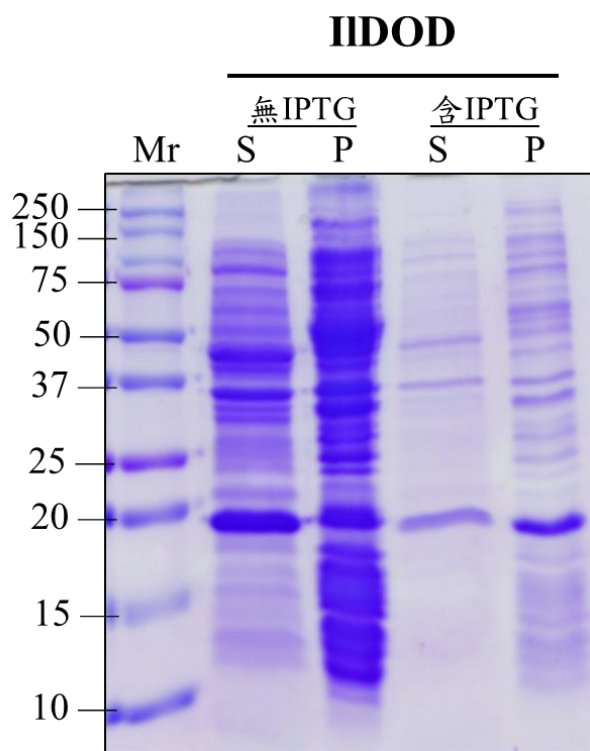


圖 3. 15%SDS-PAGE IIDOD 誘導測試圖

將 IIDOD 於 *E. coli* BL21 中進行小量誘導後，破菌所得蛋白質結果。Mr:
marker, S:supernatant P:pellet

四、蛋白質純化

利用 Ni-NTA 管柱純化 4,5-多巴雙加氧酶，並以 15% SDS-PAGE 跑膠確認純化結果(圖 4、5)。可見兩者分別在 15kDa、20kDa 左右有明顯的蛋白質訊號，與單體理論分子量接近，表示成功純化出預期之重組蛋白。

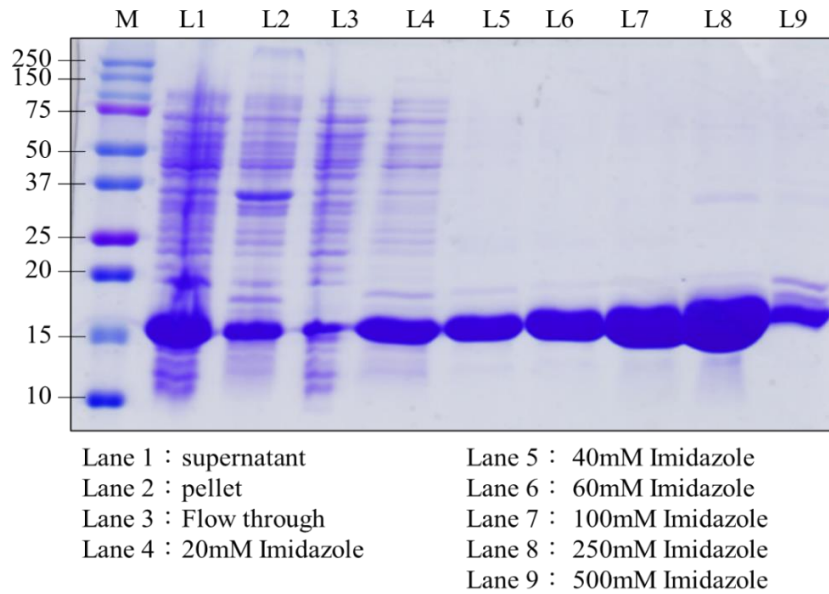


圖 4.15%SDS-PAGE KxDOD 蛋白質純化結果

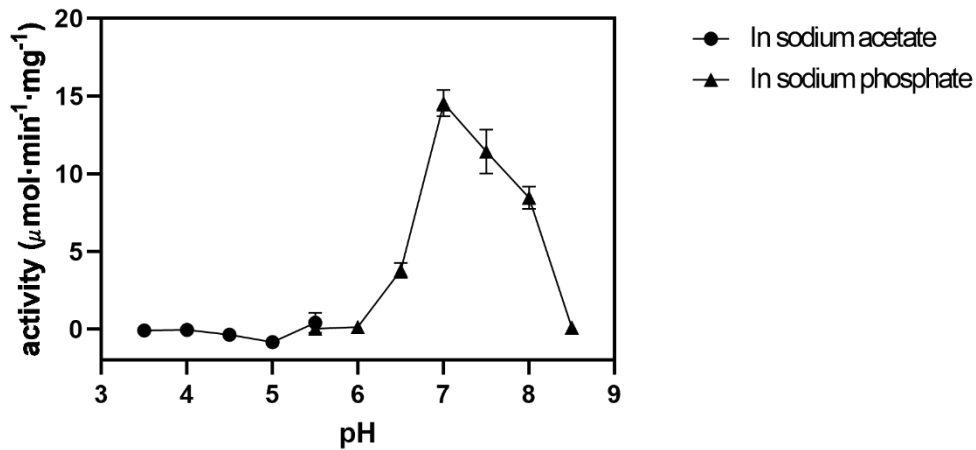


圖 6.不同 pH 值對 IIDOD 酵素相對活性

IIDOD 於 pH 值 3.5~5.5 之醋酸鈉緩衝溶液反應(以方點標示)、於 pH 值 5.5~8.5 之磷酸鈉緩衝溶液反應(以圓點標示)。反應溶液含 2.5mM L-DOPA，並反應 10 分鐘。

(二) 酵素最佳溫度活性測試

IIDOD 在 25°C~60°C 下進行反應，並測量酵素活性(圖 7)。由圖可見起初酵素活性隨溫度上升而升高，並至 37.5°C 達到最高點、具有最佳活性。而後活性隨著溫度上升而大幅下降，至 60°C 時相較最高值僅具 1/10，已幾乎無反應。如前所述，此為自人體肺部分離出之細菌，故最佳反應溫度為近人體之溫度，與該細菌的生長環境相符。然而在溫度持續上升後，酵素活性隨之降低，可能是由於酵素結構因為溫度改變而被破壞、導致活性喪失。後續將就不同溫度下的蛋白質摺疊、穩定性等資訊進行分析。

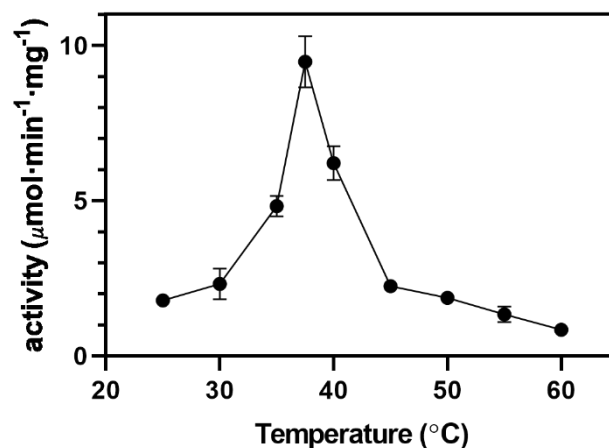


圖 7.不同溫度對 IIDOD 酵素相對活性影響

反應溶液內含濃度為 0.25mg/mL 之 IIDOD、2.5mM L-DOPA，且在 25mM pH 為 7.0 之磷酸鈉緩衝溶液下進行反應。

七、蛋白質結構解析

(一) 蛋白質晶體培養

將已純化完之重組蛋白濃縮至適當體積進行晶體培養。KxDOD 在濃縮完後，放於 4°C 冰箱隔夜即長出晶體(圖 8)，晶體培養條件為 20mM Tris pH=8.0、100mM NaCl、1mM DTT。由於多巴雙加氧酶需要鐵離子做為酵素的輔因子，為了觀察酵素反應時的狀態，在晶體培養時除了單純蛋白溶液的 Apo form 外，另外亦嘗試加入 10mM 的 FeCl₃ 來共結晶(co-crystallization)。將 IIDOD 稀釋至濃度為 10mg/mL，並利用 PCT(pre-crystallization test)測試是否為適合長晶之濃度。再使用晶體篩選套組(crystallization screen kit、以 sitting drop 的方式放置 10°C 恆溫箱進行晶體培養。一週後在 JCSG plus I 15、PEGRx II 8、PEGRx II 35、PEGRx II 37、PEGRx II 43、Proplex II 27、Screen I 39、Wizard I 22、Wizard I 41、Wizard II 23 等條件中發現有晶體生成。由於部分條件具有多晶或者細針狀，可能造成繞射點重疊或者解析度較差，故選用較大且晶型較完整的晶體蒐集數據(圖 9)。

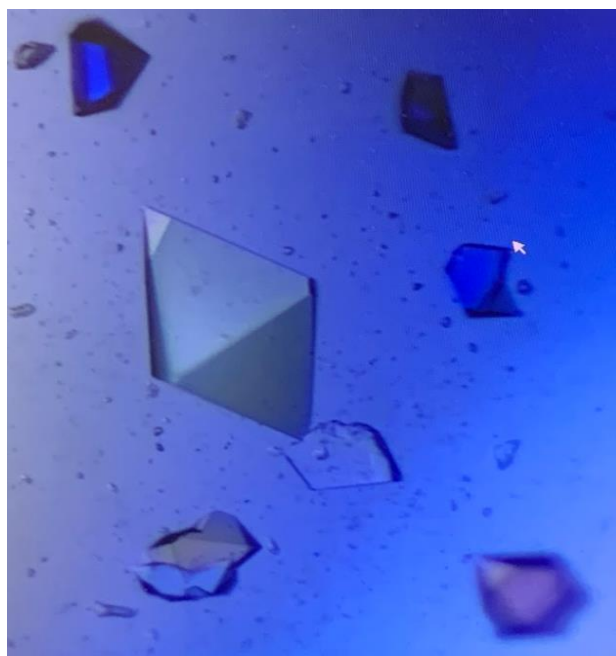


圖 8. KxDOD 於顯微鏡下之蛋白質晶體

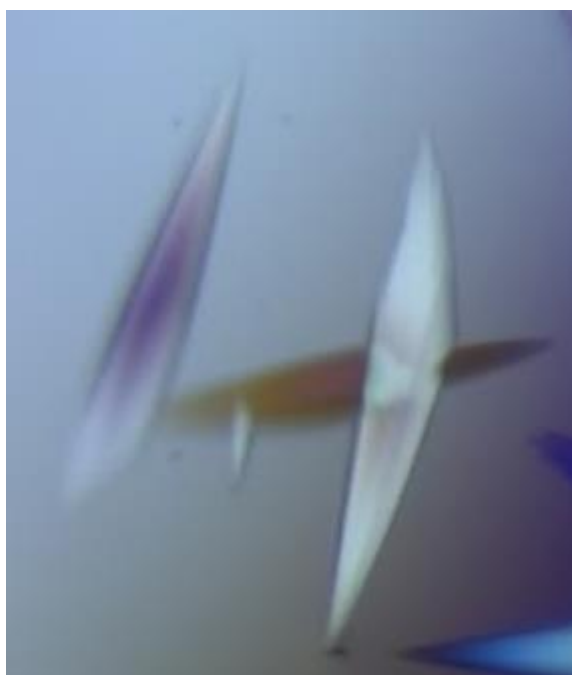


圖 9. IIDOD 於顯微鏡下之蛋白質晶體

(二) 數據收集與分析

觀察到晶體生成後，KxDOD、IIDOD 分別使用新竹國家同步輻射中心 TPS 05A、TLS BL15A1 光束線光源蒐集數據。

為了防止冰環產生，所有用於搜集數據的晶體均使用甘油(glycerol)做為抗凍劑(cryo-protectant)。晶體撈出後放置於含有 20% glycerol 之母液中浸泡約 1 至 2 分鐘，再利用液態氮瞬間冷凍並上機。由於 KxDOD 在 4°C 冰箱即生成晶體，晶體內理論上無鐵離子，為了了解 KxDOD 受質結合位結合情況，故先將 KxDOD 晶體撈出，並浸泡(soaking)於添加 10mM FeCl₃、100mM sodium ascorbate 及 2mM L-DOPA 之母液中數分鐘後，再如上述浸泡於含有甘油的溶液內。

IIDOD 在經由上機篩選後，選用在 Wizard I 22 條件內共結晶生成之晶體進行數據收集。

在蒐集 KxDOD、IIDOD 繞射點數據後，使用 HKL2000 軟體進行數據分析，包含晶格大小、空間群等資訊。

(三) 蛋白質晶體結構

1. KxDOD 蛋白質結構

(1) 晶體晶格資訊

KxDOD 晶體空間群為 $P2_12_12_1$ ，晶格參數為 $a = 68.206\text{\AA}$; $b = 68.983$; $c = 71.919\text{\AA}$ ， $\alpha = 90^\circ$; $\beta = 90^\circ$; $\gamma = 90^\circ$ 。解析度為 1.08\AA 。

(2) 蛋白質立體結構與四級結構資訊

每個 KxDOD 單體單元由 3 個 α -helices、5 個 β -sheets 及 3 個 3^{10} -helices 組成(圖 10(A)(E))，在晶格內以二聚體(dimer)的形式存在(圖 10(B))。將所解出之晶體結構利用 Ramachandran plot 進行分析(圖 10(C))，可得知有 89.1%的胺基酸落在偏好區，10.9%的胺基酸落在允許區，無任何胺基酸落於不允許區，符合合理的立體位向。

由於晶體為排列堆疊的結果，可能與水溶液中之情況不同。故利用分子篩(gel filtration)確認蛋白在水溶液內的四級結構與晶體結構所顯示的相符。實驗中使用 20mM Tris pH=8.0，100mM NaCl 的沖堤緩衝溶液，在流速為 0.4mL/min 下沖堤，並監測溶液在波長 280nm 下的吸收。可見在 11.54mL 時有單一波峰(圖 10(D))，且代入校準曲線後，得出在該流洗體積下所沖堤出之蛋白分子量應為 37.68kDa，代表在水溶液中 KxDOD 亦以二聚體形式存在，與晶體結構所顯示相符。

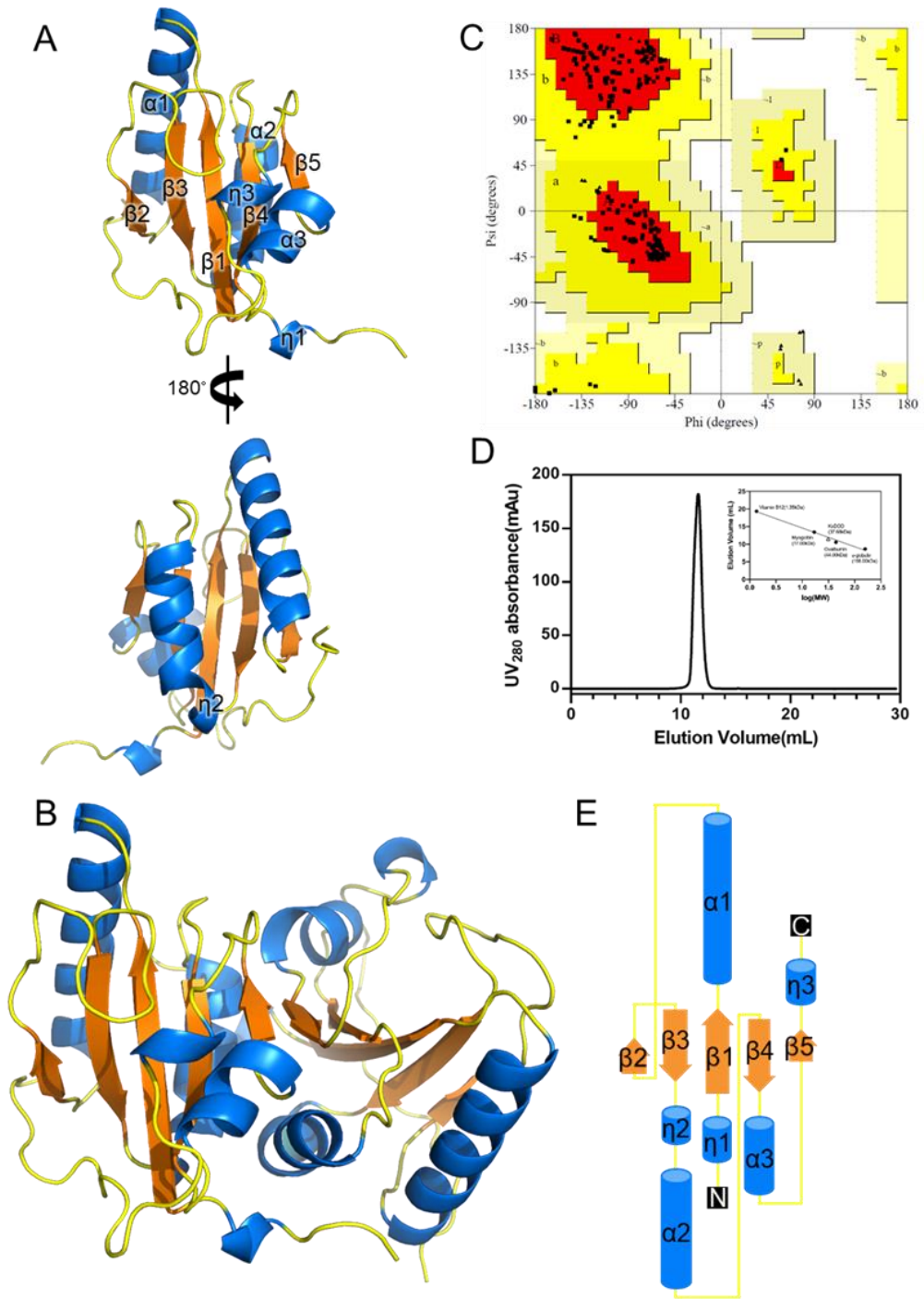


圖 10.KxDOD 蛋白質立體結構

(A) KxDOD 單體結構。 (B) KxDOD 二聚體結構。

(C) KxDOD 膠體過濾法分析結果。插圖為不同蛋白質之校準曲線，由沖提體積可決定 KxDOD 在水溶液中應以二聚體形式存在。

(D) Ramachandran plot 分析結果。偏好區標示為紅色，允許區標示為黃色，不允許區標示為白色。

(E) KxDOD 的 topology diagram。

2. IIDOD 蛋白質結構

(1) 晶體晶格資訊

IIDOD 晶體空間群為 $P6_522$ ，晶格參數為 $a = 48.525\text{\AA}$; $b = 48.525\text{\AA}$; $c = 242.002\text{\AA}$ ， $\alpha = 90^\circ$; $\beta = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$ 。解析度為 1.58\AA 。

(2) 蛋白質立體結構與四級結構資訊

由於 IIDOD 與 KxDOD 序列上有高度相似性，每個 IIDOD 單體單元由 3 個 α -helices、5 個 β -sheets 及 3 個 3^{10} -helices 組成(圖 11(A)(D))，與 KxDOD 相同。然而在晶格內以單體形式存在，推測原因可能是此空間群具有高度對稱性，故單元晶格內僅含一個 IIDOD 分子。利用 pymol 軟體顯示相鄰之單元晶格結構，可見在其中一個位向中，兩個 IIDOD 分子的排列方式與 KxDOD 相同(圖 11(B))。未來將再利用分子篩進行四級結構分析，以得知 IIDOD 於水溶液中之真實情況。將所解出之晶體結構利用 Ramachandran plot 進行分析(圖 11(C))，可得知有 87.6% 的胺基酸落在偏好區，12.4% 的胺基酸落在允許區，無任何胺基酸落於不允許區，亦符合合理的立體位向。

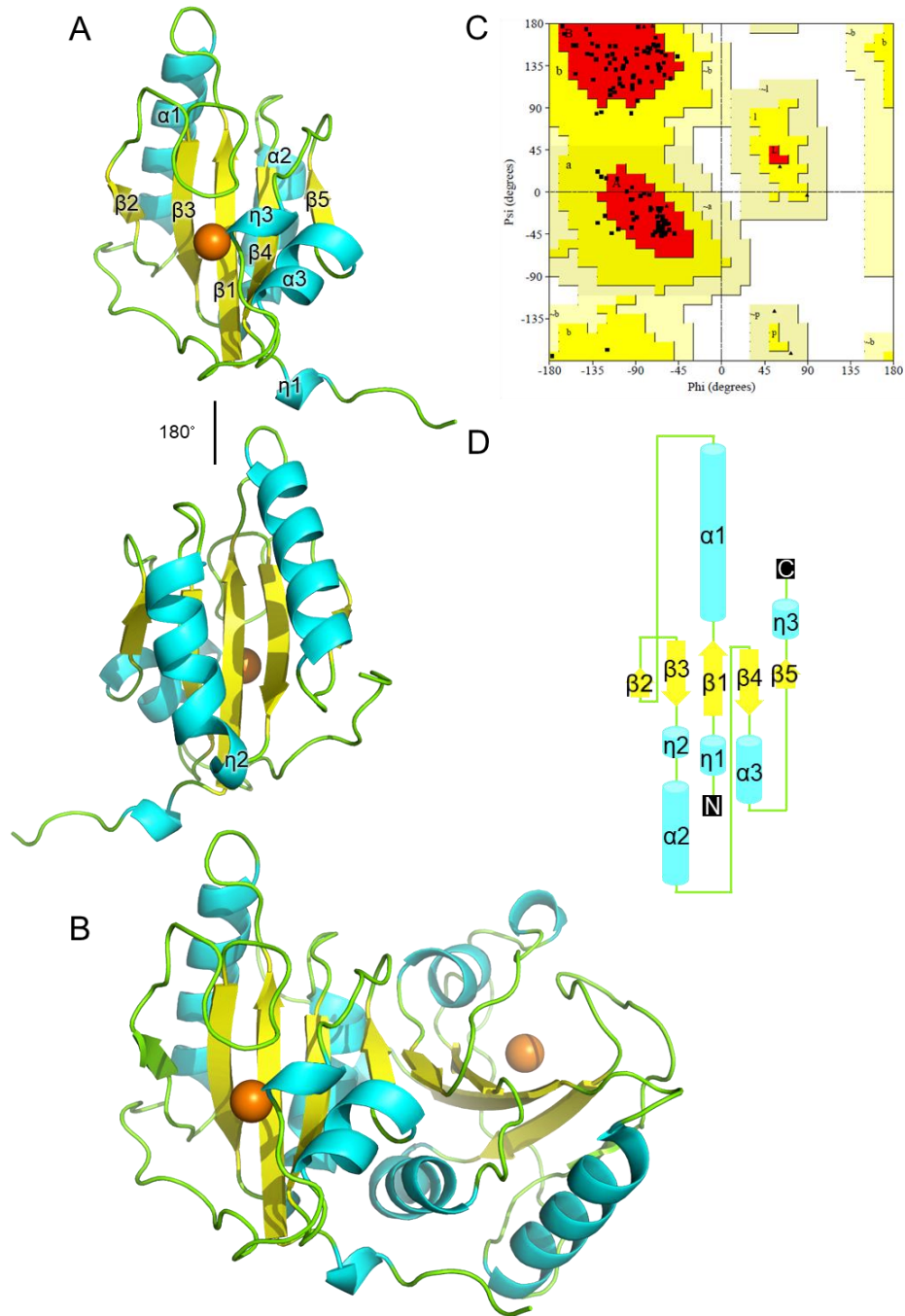


圖 11.IIDOD 的蛋白質立體結構

- (A) IIDOD 單體結構。
 (B) IIDOD 在水溶液可能存在的二聚體形式。
 (C) 利用 Ramachandran plot 分析 IIDOD 蛋白質結構之結果。
 (D) IIDOD 的 topology diagram。

(四) 受質結合位與預測 L-DOPA 分子結合方式

1. KxDOD、IIDOD 受質結合位資訊

多巴雙加氧酶需要鐵二價離子作為輔因子進行催化。於酵素反應時，受質結合位中鐵離子會以六配位的形式存在，包括蛋白質提供的3個組胺酸(His)殘基、氧氣及L-DOPA的兩個羥基。目前解出的KxDOD、IIDOD的結構中，未有L-DOPA、氧氣的電子密度圖。在未有受質進行反應前，氧氣、L-DOPA形成的三個配位基，由3個H₂O取代並形成六配位(圖12(A)(B))。然而在先前量測活性時，相較於控制組、KxDOD並無額外有414nm的吸收值。但將兩者的受質結合位進行疊圖比較(圖12(C))，可發現兩者胺基酸殘基種類、擺放的角度均相同，應不是由於重要胺基酸演化上突變造成的影響。

2. 模擬L-DOPA分子結合情況

由於浸泡KxDOD晶體後仍未能獲得含有L-DOPA電子密度圖之數據，且目前仍未進行IIDOD晶體浸泡的實驗。此處先將其中一個水分子的氧模擬為氧氣結合位，並下載網路上提供之L-DOPA 3D立體圖形，使用pymol軟體、透過人工的方式將L-DOPA擺放至受質結合位中，模擬受質結合的情況(圖12(D))。可看到L-DOPA的兩個羥基恰可放置於兩個水分子的位置，並與其餘三個組胺酸殘基(KxDOD: H18, H91, H101; IIDOD: H17, H90, H100)、氧氣形成六配位。而剩餘相鄰於鐵離子的組胺酸(KxDOD: H20, IIDOD: H19)應作為路易斯酸的角色，於酵素反應中提供質子。後續將再嘗試透過浸泡的方式獲得L-DOPA結合於受質結合位的電子密度圖，並了解結合方式與反應機制。

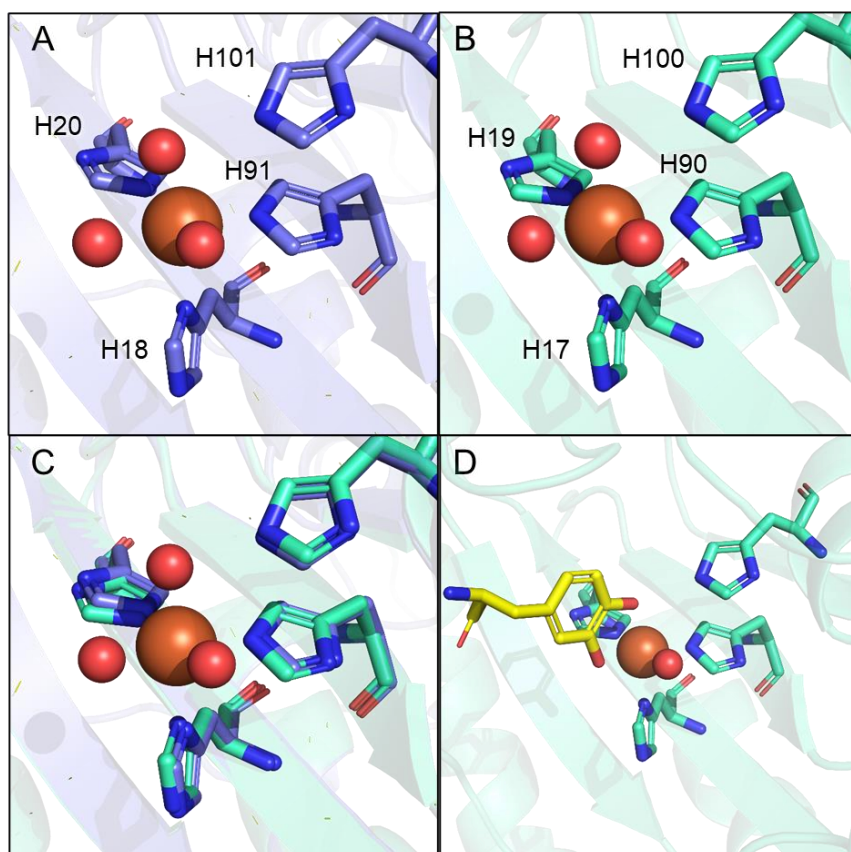


圖 12.KxDOD、IIDOD 受質結合位之立體結構

- (A) KxDOD 受質結合位附近之結構，橘色為 Fe^{2+} 離子，紅色為水分子。
 (B) IIDOD 受質結合位附近之結構。
 (C) KxDOD, IIDOD 受質結合位結構疊合圖。
 (D) 模擬 L-DOPA 結合於 IIDOD 受質結合位之情形。

(五) 受質結合位電荷分布圖

由於 KxDOD 受質結合位中重要胺基酸並未有演化上突變的情形，故再分析鄰近區域正負電荷。兩個蛋白質整體電荷分布情形如圖 13(A)(B)所示，受質結合位附近電荷分布圖如圖 13(C)(D)所示。將圖 13(C)(D)兩圖進行比較，可發現 KxDOD 結合 L-DOPA 的區域中較為正電(藍色)，而 IIDOD 結合 L-DOPA 的區域較呈現電中性(白色)。由於 L-DOPA 為帶有苯環、較疏水的分子，較不偏好帶有電荷的環境。又 KxDOD 受質結合位附近較為極性，可能造成受質不易進入結合、因此無活性或活性過低無法被偵測。

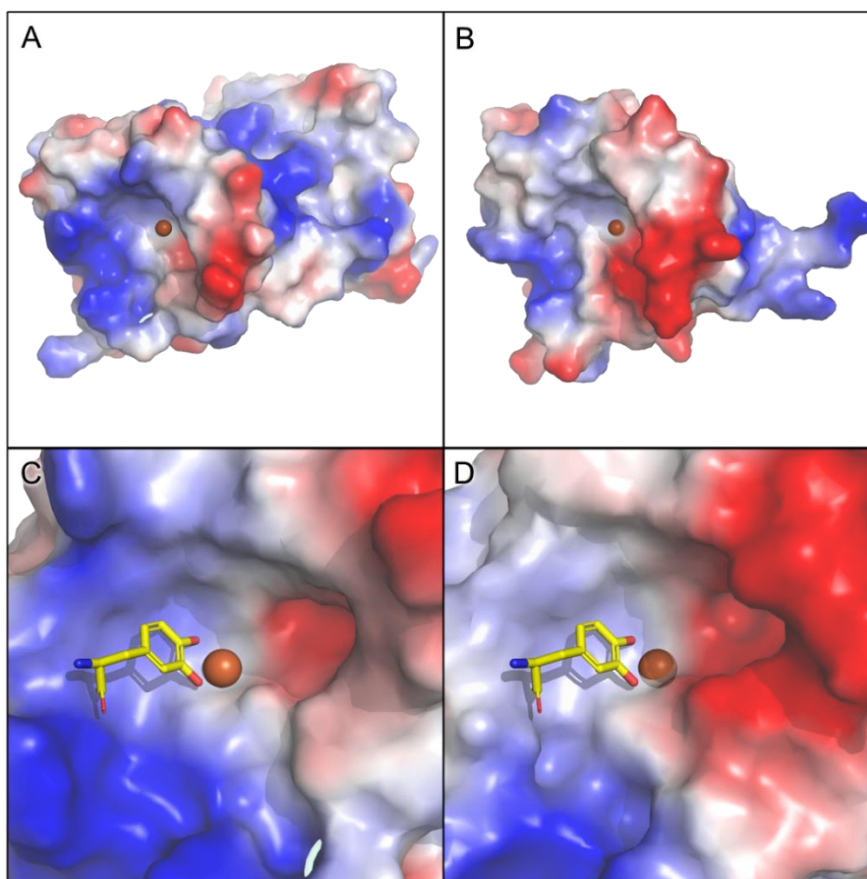


圖 13.比較 KxDOD、IIDOD 於受質結合位之表面電荷分布

(A) KxDOD 整體之立體結構。

(B) IIDOD 整體之立體結構。

(C) KxDOD 受質結合位附近表面電荷分布。

(D) IIDOD 受質結合位附近表面電荷分布。橘色為鐵二價離子，亮黃色為 L-DOPA。

八、酵素動力學

以前述活性實驗得之最佳活性 pH 為 7.0 進行酵素動力學實驗。反應溶液配置完成後，25°C 下反應 10 分鐘，測量 414nm 吸光值。10 分鐘後，將 414nm 吸光值換算成甜菜醛胺酸濃度，取反應初始線性範圍內吸光值之斜率作為反應初速度。將所得數據帶入 Michaelis-Menten Equation，計算得 IIDOD 之 $K_m=1.141\text{mM}$ 、 $k_{cat}=0.465\text{min}^{-1}$ 。(圖 14)

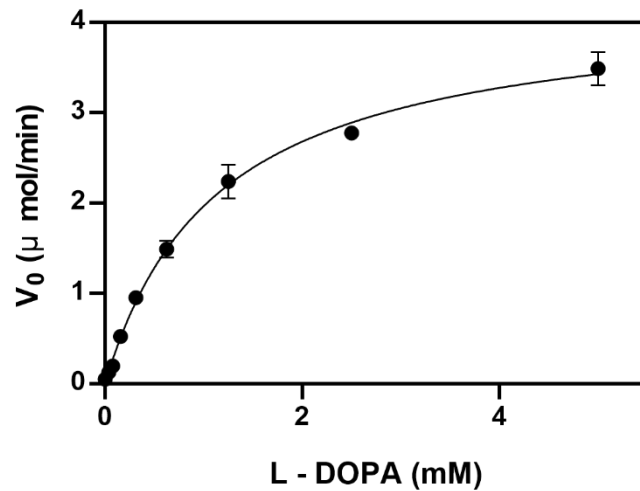


圖 14.IIDOD 之酵素動力學

九、4,5-多巴雙加氧酶與酪胺酸酶結合

(一) 引子序列

設計引子以利用 PCR 放大細胞製造 IIDOD 與酪胺酸酶之基因片段。

(表 2)

表 2.引子序列

字體顏色紅色為切位，斜體為額外補上之鹼基對

蛋白種類	所使用限制酶		引子全長序列(5'~3')
IIDOD	Forward	NdeI	CGCCATATGGAAAGTGATGCAGCACCGCGTCGT
	Reverse	XhoI	CCGCTCGAGTTATGCAGGACGATCCGGTTCGGT
酪胺酸酶	Forward	EcoRI	CCGGAATTCGCATTTCCCTAGAGCCTGTGTCTCC
	Reverse	NotI	AAATATGCGGCCGCGCTTGTTCCAAATAGGACTTAAT

(二) 瓊脂糖凝膠電泳 (agarose gel electrophoresis)

利用電泳檢測 IIDOD PCR 結果。如圖 15，顯示長度約為 500 bp，與實際長度符合，表有成功複製基因片段。

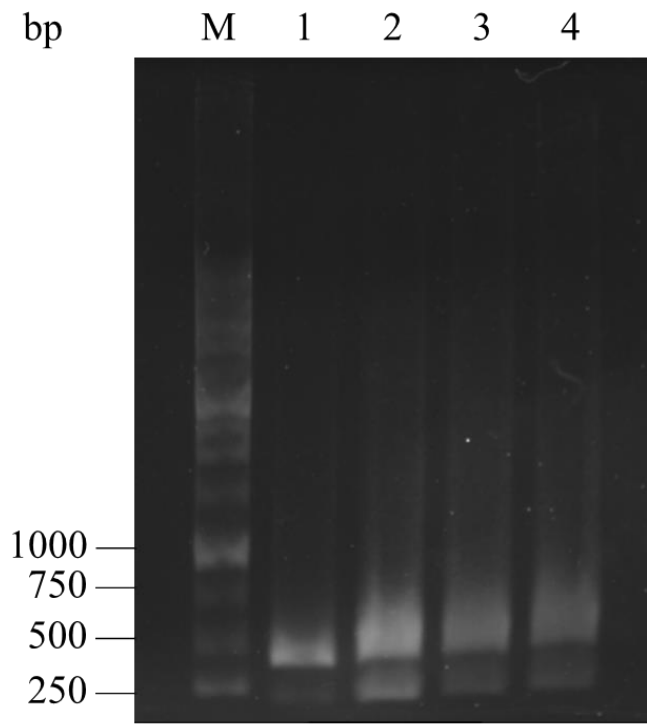


圖 15. IIDOD PCR 電泳圖
1~4 為不同管 PCR 結果

肆、結論與應用

於 109 年 12 月至 110 年 10 月期間，我們已透過基因選殖得到 IIDOD、KxDOD 兩種重組蛋白之純化，透過酸鹼值、溫度活性測試得出 IIDOD 酵素最佳反應條件為 pH=7、溫度 37.5°C 之環境，並在室溫下進行一次酵素動力學實驗；且得到兩種蛋白晶體並分析，討論活性與結構、電荷分布等關聯性。應用層面已設計出雙加氧酶與酪胺酸酶引子，並成功合成。

未來應用：

一、嘗試其他測量方式

目前所使用的方式為使用分光光譜儀測量 414nm 之吸光值。若要偵測更低濃度之甜菜醛胺酸生成，可利用螢光方式以增加其訊號靈敏度。根據相關文獻，以特定波長激發螢光後測量發射光譜可增加測量極限(背景值標準差/校準曲線斜率 ≥ 3)至 2.8 μ M。而人體血液生理環境之 L-DOPA 濃度約為 10 μ M，於測量之線性範圍內，因此未來將嘗試此測定方式進行定量、檢測實驗。

二、結合酪胺酸酶以微生物體生產甜菜素

目前已成功設計並合成出可放大 IIDOD 與酪胺酸酶基因片段之引子，並完成 IIDOD 初步 PCR，未來將進行酪胺酸酶的 PCR、純化 PCR 產物，利用以設計好之限制酶切位接入 pETDuet-1 質體中，並將質體進行定序。後續將進行質體轉型、定序以及抽質體等，並測試生產效率。

三、L-DOPA 濃度測量

若要將多巴雙加氧酶用於監控帕金森氏症病患服藥後血液內 L-DOPA 之濃度，則需取得不同濃度的 L-DOPA 與酵素完全反應後吸光值(414nm)的線性關係。後續將測量酵素在最適環境下，需要多少時間才可將受質完全反應為產物，並購買、配置甜菜醛胺酸當作標準品，而後即可將反應後測出的吸光值透過內插法，推知原始 L-DOPA 濃度。

四、分析 IIDOD 與 KxDOD 活性差異原因

於酵素活性測試中，IIDOD 具活性，而 KxDOD 則是無活性或過微弱無法偵測。推測 KxDOD 受質結合位附近較為極性，而 L-DOPA 屬非極性分子，可能造成受質不易進入結合、因此無活性或活性過低無法被偵測；亦有可能是催化受質與 IIDOD 不同，將進一步分析，透過活性位點等改良酵素。

伍、參考文獻

1. Gandía-Herrero, F.; Escribano, J.; García-Carmona, F., Betaxanthins as pigments responsible for visible fluorescence in flowers. *Planta* **2005**, *222* (4), 586-93.
2. Gandía-Herrero, F.; García-Carmona, F., Escherichia coli protein YgiD produces the structural unit of plant pigments betalains: characterization of a prokaryotic enzyme with DOPA-extradiol-dioxygenase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2014**, *98* (3), 1165-1174.
3. Guerrero-Rubio, M. A.; García-Carmona, F.; Gandía-Herrero, F., First description of betalains biosynthesis in an aquatic organism: characterization of 4,5-DOPA-extradiol-dioxygenase activity in the cyanobacteria *Anabaena cylindrica*. *Microbial Biotechnology* **2020**, *13* (6), 1948-1959.
4. Bastide, M. F.; Meissner, W. G.; Picconi, B.; Fasano, S.; Fernagut, P.-O.; Feyder, M.; Francardo, V.; Alcacer, C.; Ding, Y.; Brambilla, R.; Fisone, G.; Jon Stoessl, A.; Bourdenx, M.; Engeln, M.; Navailles, S.; De Deurwaerdère, P.; Ko, W. K. D.; Simola, N.; Morelli, M.; Groc, L.; Rodriguez, M.-C.; Gurevich, E. V.; Quik, M.; Morari, M.; Mellone, M.; Gardoni, F.; Tronci, E.; Guehl, D.; Tison, F.; Crossman, A. R.; Kang, U. J.; Steece-Collier, K.; Fox, S.; Carta, M.; Angela Cenci, M.; Bézard, E., Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* **2015**, *132*, 96-168.
5. Fahn, S., The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Movement Disorders* **2008**, *23* (S3), S497-S508.
6. Contreras-Llano, L. E.; Guerrero-Rubio, M. A.; Lozada-Ramírez, J. D.; García-Carmona, F.; Gandía-Herrero, F., First Betalain-Producing Bacteria Break the Exclusive Presence of the Pigments in the Plant Kingdom. *mBio* **2019**, *10* (2), e00345-19.
7. Wang, Y.; Shin, I.; Fu, Y.; Colabroy, K. L.; Liu, A., Crystal Structures of L-DOPA Dioxygenase from *Streptomyces sclerotialis*. *Biochemistry* **2019**, *58* (52), 5339-5350.
8. Govind, J. K.; Magnus, A. A.; Rao, G. S.; Takanari, A.; Akira, I.; Harukuni, T., Cytotoxic Effect of the Red Beetroot (*Beta vulgaris* L.) Extract Compared to Doxorubicin (Adriamycin) in the Human Prostate (PC-3) and Breast (MCF-7) Cancer Cell Lines. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **2011**, *11* (3), 280-284.

【評語】 080011

本研究利用基因體資訊鎖定微生物源 4,5-多巴雙加氧酶 (DOD)，經基因選殖與蛋白表現後，將重組的 DOD 蛋白純化並探討其結構與生化功能。DOD 可將 L-DOPA 轉換成甜菜醛胺酸 (betalamic acid)，甜菜醛胺酸再與 L-DOPA 反應成甜菜黃素 (betaxanthin)。研究相當完整，並獲初步成果，對於甜菜素的微生物生產方法或巴金斯症藥物的開發具有一定的貢獻。

建議：

1. 本研究構想很好，也一步一步地成功解出 KxDOD 與 IIDOD 結構。KxDOD 催化 L-DOPA 的活性低，有可能 KxDOD 在木質醋酸菌內的受質不是 L-DOPA。
2. 將 tyrosine 轉化成 L-DOPA 不是酪胺酸酶(tyrosinase)，而是 tyrosine hydroxylase，所以合成甜菜素是要共同表達 DOD 與 tyrosine hydroxylase，但 tyrosine hydroxylase 製造 L-DOPA 需要 tetrahydrobiopterin，不知道微生物是否也可合成 tetrahydrobiopterin？ 不能的話，如何加入此輔基合成醇素？

3. 目前解出的 KxDOD、IIDOD 的結構中，未有 L-DOPA、氧氣的電子密度圖。可嘗試把產物加入做共結晶。
4. 於酵素活性測試中，IIDOD 具活性，而 KxDOD 則是無活性或過微弱無法偵測，可能跟得不到 L-DOPA、氧氣的電子密度圖有關。因為 IIDOD 具活性，應可嘗試目前仍未進行的 IIDOD 晶體浸泡實驗。