微生物谷胺酰胺转氨酶在蛋白质修饰中的应用

程孝中[1,2]，赵鑫锐[1]，洪皓飞[1]，杨 敏[1]，周志昉[1]，吴志猛[*1]

（1. 江南大学 教育部糖化学与生物技术重点实验室，江苏 无锡 214122；2. 亳州学院 生物与食品工程学院，安徽 亳州 236800）

摘要：谷胺酰胺转氨酶能催化蛋白质中谷氨酰胺与赖氨酸间的酰基转移反应，广泛应用于食品、纺织等工业。近年来，微生物来源的谷胺酰胺转氨酶，具有易得、反应条件温和、不依赖钙离子调节等优点，被广泛应用于蛋白质的定点修饰。通过基因工程手段，在蛋白质的特定部位引入谷胺酰胺转氨酶特异性识别的 Q-Tag 和 K-Tag，谷胺酰胺转氨酶能催化抗体与小分子之间、蛋白质与蛋白质之间、蛋白质与聚合物之间、蛋白质与糖类物质之间、蛋白质与脂质体之间的定点偶联以及短肽的自身环化。这些蛋白质定点修饰产物在药物化学、化学生物学以及生物材料等领域有着广泛的用途。本文作者综述了近年来微生物谷胺酰胺转氨酶在蛋白质定点修饰中的最新进展。

关键词：谷胺酰胺转氨酶；蛋白质；定点修饰；多肽；聚合物；糖

中图分类号：Q 51　**文章编号：**1673-1689(2019)06-0001-10　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.06.001

Recent Applications of Microbial Transglutaminase in Protein Modificaiton

CHENG Xiaozhong[1,2]，*ZHAO Xinrui*[1]，*HONG Haofei*[1]，*YANG Min*[1]，*ZHOU Zhifang*[1]，*WU Zhimeng*[*1]

（1. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology，Ministry of Education，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；2. Department of Biological and Chemical Engineering，Bozhou university，Bozhou 236800，China）

Abstract： Transglutaminases are a family of enzymes to ligate the carbonyl group of glutamines and the ε-amine group of lysine to form an amide bond between proteins. This conjugation technology was widely used in food and textile industry initially. Recently，microbial transglutaminases (MTGase) mediated ligation was developed into a useful tool for site-specific modification of protein because of the advantages，such as easy availability，mild reaction condition and Ca^{2+}-independent etc. By introducing MTGase recognized Q-tag and K-tag into protein using genetic engineering technology，many molecules，including small molecular drugs，proteins，polymers，oligosaccharides and lipids are conjugated to proteins，and peptide cyclized through this site-specific acyl transfer reaction. These conjugates were extensively used in the fields of medicinal chemistry，chemical biology and biomaterials. This review focused on the recent progress of MTGase mediated

收稿日期：2016-12-09

基金项目：国家自然科学基金项目(21472070)；江苏省特聘教授项目(2014)；江苏省“六大人才高峰”项目(2014-SWYY-017)；江苏省创新团队项目(2014)。

作者简介：程孝中(1983—)，男，博士，讲师，主要从事蛋白质化学酶法修饰。E-mail：chengxiaozhong10@163.com

*** 通信作者：**吴志猛(1976—)，男，教授，博士，博士研究生导师，主要从事糖类药物化学研究。E-mail：zwu@jiangnan.edu.cn

引用本文：程孝中，赵鑫锐，洪皓飞，等. 微生物谷胺酰胺转氨酶在蛋白质修饰中的应用[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(06)：01-10.

site-specific protein modification.
Keywords: transglutaminases,protein,site-specific modification,peptides,polymer,oligosaccharide

蛋白质是生命中最重要的生物大分子,蛋白质通过修饰,形成不同功能的蛋白质,生物体内修饰主要包括泛素化、磷酸化、乙酰化、糖基化、甲基化等[1]。酶参与的蛋白质定点修饰是近年来发展起来的一类新的蛋白质修饰方法。该法具有反应条件温和,通常在水溶液和中性的 pH 环境下反应;催化的反应具有高度的专一性,能够实现对蛋白质的区域和位点专一性修饰等优点而备受关注。最近研究比较多的酶主要有甲酰甘氨酸生成酶、唾液酸转移酶、磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶 (PPTase)、O-GlcNAc 糖基转移酶、分选酶(Sortase)、谷氨酰胺转移酶(Transglutaminases)、脂肪酸转移酶、生物素连接酶、硫辛酸连接酶、N-肉豆蔻酰基转移酶等[2]。其中的谷氨酰胺转氨酶修饰可形成异肽键(isopeptide bond),修饰后的产物不容易被蛋白酶降解,而且这种修饰反应和分选酶的可逆反应不一样,是一种单向不可逆反应,有利于提高产率[3]。因此,谷氨酰胺转氨酶在蛋白质修饰中被广泛关注。

谷氨酰胺转移酶主要分成两大类。动物来源的谷氨酰胺转氨酶(Transglutaminase 2,TG2)主要参与内吞作用、细胞凋亡、细胞粘附等生命活动,它是一类依赖于钙离子的谷氨酰胺转氨酶[4-6]。微生物谷氨酰胺转移酶(Microbial transglutaminases,MTGase)首次从链霉菌(*Streptomyces mobaraensis*)中分离得到,在自然界中主要催化蛋白质之间的共价连接,这种特别的功能长期以来主要应用于食品和纺织工业中的蛋白质交联,从而改变肉、羊毛、皮革的特性[7]。作为一种易得、便于使用、不依赖钙离子调节的 MTGase,近年来被广泛应用于蛋白质定点修饰。

本文作者综述了微生物来源谷氨酰胺转移酶在蛋白质定点修饰中的最新进展,这些定点修饰包括抗体与小分子之间、蛋白质与蛋白质之间、蛋白质与聚合物之间、蛋白质与糖类物质之间、蛋白质与脂质体之间的定点偶联以及短肽的自身环化。

1 MTGase 的结构及催化机理

MTGase 内部的二级结构是由 8 个 β 折叠组成,外部是 11 个 α 螺旋,分子呈盘状并带有一个裂缝,2 个环组成裂缝左壁,1 个环组成裂缝右壁,裂缝深度为 16 Å,催化活性基团 Cys64、Asp255 和 His274 均位于分子裂缝底部[8](图 1),催化反应时,底物进入裂缝与催化活性基团结合。MTGase 最初以酶原形式存在,N 端螺旋结构占据裂缝空间,阻止底物进入裂缝参与反应[9],当 N 端螺旋结构被内源性的金属蛋白酶和氨肽酶切去后转变为有催化活性的 MTGase [10-11]。利用氨基酸突变技术,发现 Asp255 和 His274 在催化底物时发挥主要作用[12]。

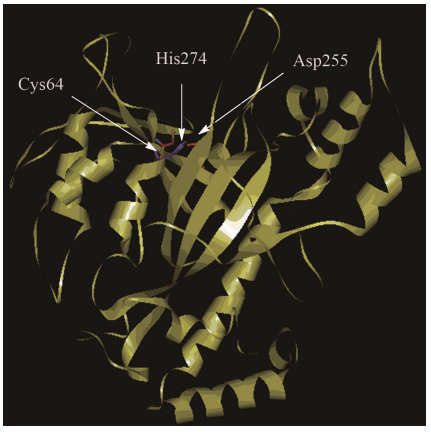


图 1 MTGase 晶体结构

Fig. 1 Overall sturcture of microbial tranlglutaminase

MTGase 催化蛋白质肽链中谷胺酰胺 γ-羧酰胺基(酰基供体)与各种酰基受体发生酰胺基转移反应,在蛋白质和多肽当中,谷氨酰胺常作为酰基供体,赖氨酸作为酰基受体发生酰基转移反应。催化反应时,Cys64 侧链的 S 亲核攻击酰基供体谷氨酰胺侧链基团上的 C 原子(图 2 中(a));Asp255 提供一个质子给氧离子中间体并释放出氨(图 2 中(b)、(c)、(d)),Asp255 形成带负电的活化基团;然后酰基受体(例如赖氨酸侧链)在空间上接近 Asp255 活化基团被亲核攻击并释放产物(图 2 中(e)、(f))。根据酰基受体的不同,催化反应可以分为 3 类[13]:1)酰基转移反应,伯胺作为酰基受体(图 3(a));2)谷氨酰胺和赖氨酸间的交联反应,此时赖氨酸作为酰基受体,这种反应主要出现在蛋白片段或者多肽间的连接反应(图 3(b));3)脱酰基作用,水作为酰基受体(图 3(c))。

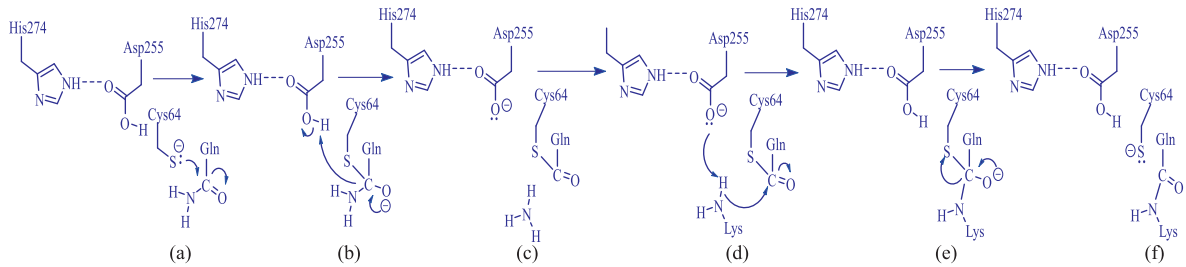


图 2　MTGase 催化机理

Fig. 2　Catalytic reaction mechanism of MTGase

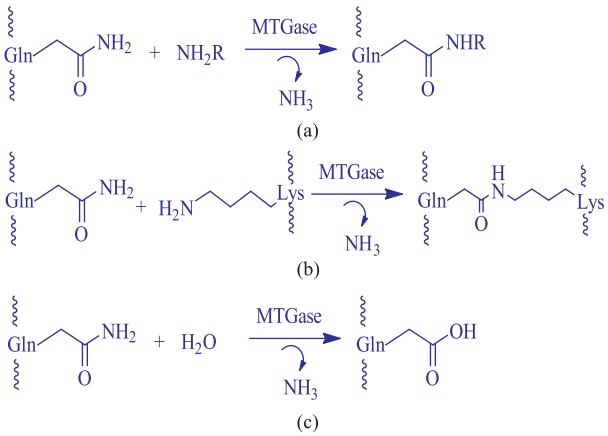


图 3　MTGase 催化的化学反应

Fig. 3　Reactions catalyzed by microbial transglutaminase

MTGase 对底物具有一定的特异选择性。对于酰基供体谷氨酰胺来说，其附近的氨基酸对 MTGase 的活性有较大影响。Sugimura Y 等[14]利用肽文库展示技术研究 MTGase 最适底物肽发现：当谷氨酰胺 N 端−3 位与−2 位分别是芳香族氨基酸和亮氨酸，谷氨酰胺 C 末端+1、+2 位和+3 位分别是精氨酸、脯氨酸和酪氨酸时，MTGase 催化活性最高。在这种规律基础之上，Oteng-Pai 等[15]合成了一系列的五肽和七肽，研究与 MTGase 结合活性时发现：七肽底物 7M42（Ac-YELQRPY-NH2）和 7M48（Ac-WALQRPH-NH2）与 MTGase 亲和力最大。另外，Lee[16]课题组利用 mRNA 展示技术筛选出了高亲和力的五肽底物（RLQQP 和 RTQPA），这些 Q-Tag 常用于 MTGase 对蛋白质定点修饰当中（表 1）。相对酰基供体谷氨酰胺，MTGase 的酰基受体底物比较广泛[17−18]，对于非天然的酰基受体而言，伯胺类底物要求伯氨基团与临近的功能基团之间必须间隔 4 个以上无侧链碳原子才能获得较高的反应活性；与伯胺相连的烷基链越长，反应活性越高；因此 MTGase 可以催化 ω-氨基酸、精胺、腐胺、尸胺、羟胺和 N,N-二甲基-1,4 -苯二胺等非天然的酰基受体[17,19−20]。在天然的酰基受体中，也存在活性比较高的序列，Lee [21] 课题组利用荧光共振能量转移技术（Fluorescence resonance energy transfer，FRET）筛选到一个活性比较高的赖氨酸识别序列（K-Tag）KTKTN，这种五肽底物的活性高于传统的 6 个赖氨酸标签（K6）。

表 1　微生物谷氨酰胺转移酶识别的 Q/K-Tag

Table 1　Examples of Q/K-Tag Recognized by Microbial Transglutaminase

修饰的蛋白质	Q/K-Tag
绿色荧光蛋白（GFP）[22]	MRHKGS GGGSLLQG
二氢叶酸还原酶（DHFR）[23]	EQKLISEEDLGC
碱性磷酸酶（AP）[24]	MKHKGS MKHK(GGGS)2GS
麦芽糖结合蛋白（MBP）[25]	WALQRPH WELQRPY YPMQGWF
胰高血糖素样肽-1（GLP-1）[26]	LQSP
IgG 抗体 1（IgG1）[27]	LLQGG

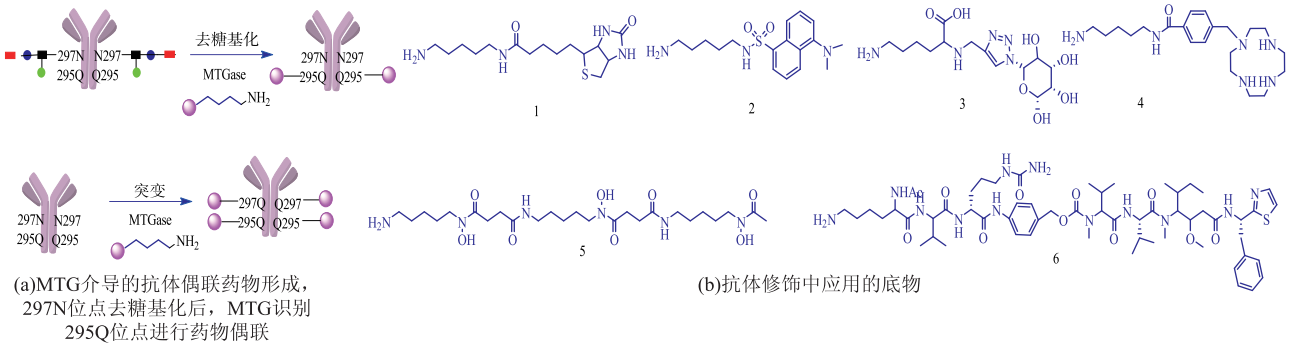
2　MTGase 在蛋白质定点修饰中的应用

2.1　MTGase 在抗体定点修饰中的应用

将小分子药物连接到抗体上形成抗体偶联药物（Antibody Drug Conjugates，ADCs），能够提高药物治疗效果、安全性和靶向性。随着治疗乳腺癌和淋巴瘤的抗体偶联药物 Kadcyla 和 Adcetris 的成功上市[28]，抗体偶联药物成为一个新的研究热点。和临床上其他的 ADCs 一样，Kadcyla 和 Adcetris 都是由小分子药物通过化学方法随机偶联至抗体的赖氨酸位点，平均每个抗体可以偶联 3-4 个小分子药物，形成的药物复合物均一性较差[29]。这种不均一性给 ADCs 药物的质量控制，药物稳定性以及治疗效果

带来不确定性。因此,发展 ADCs 药物的定点偶联技术十分必要。

利用 MTGase 连接药物与蛋白质，必须要求目标蛋白质要有活性的谷氨酰胺,对于相对分子质量比较大的蛋白质，此类谷氨酰胺较多，例如 IgG1 (typical immunoglobulin Gamma1)大约有 60 个谷氨酰胺,Josten[30]将氨基修饰过的生物素衍生物(图 4(b)1) 作为酰基受体偶联至抗体上的谷氨酰胺,平均每个抗体只能连接一到两个生物素,而且无法确认这些生物素所连接的特定位点,这势必影响连接效率和均一性。 由于抗体上不同位点的偶联会影响 ADCs 药物在体内分布、降解、药物稳定性和药代动力学[31-32],所以,Josten 等人的修饰方式往往导致 ADCs 药物相对狭窄的治疗指数。Pavel[27]与他们的合作者则利用基因工程手段将单克隆抗体 IgG1 的重链 C 端带上 Q-Tag(LLQGG),可以将带有氨基标签的荧光素(图 4(b)2)、糖衍生物(图 4(b)3)、螯合剂(图 4(b)4,4(b)5)、微管蛋白抑制剂(图 4(b)6)、热休克蛋白 90 抑制剂、DNA 损伤药物连接到抗体上;另外,这种定点修饰可以发生在抗体的 Fab 和 Fac 结构域，其中荧光基团的偶联效率可以达到 79%。Q-Tag 的定点引入极大地提高了 ADCs 与小分子药物偶联的均一性。



(a)MTG介导的抗体偶联药物形成，297N位点去糖基化后，MTG识别295Q位点进行药物偶联

(b)抗体修饰中应用的底物

图 4　MTGase 在抗体定点修饰中的应用

Fig. 4　Application of MTG to antibody modification

除了将药物利用 MTGase 偶联到抗体上外,MTGase 还可以将一些放射性核素偶联至抗体,抗体与放射性核素的偶联在放射影像学以及诊断学有重要作用。例如,对 chCE7 抗体进行 Ga 标记,可以追踪抗体在生物体内放射性分布;把抗体与 Zr 偶联标记可进行 X 断层扫描[33]。在对 chCE7 抗体进行放射免疫偶联时，研究者发现 [27,33-36],chCE7 抗体 297 位的天冬酰胺由于糖基化导致 295 位的谷氨酰胺无法进行偶联,当 297 位去糖基化后,295 位的谷氨酰胺具有很好的偶联活性;或者将 297 位突变成谷氨酰胺,297 和 295 两个位点都可以进行偶联。这是因为 297 位的糖基化使得 295 位的谷氨酰胺位点由于空间位阻很难被 MTGase 所识别，如果去糖基化或者突变使得 295 位点暴露来[37](图 4(a)),反应则可进行。

2.2　MTGase 在蛋白质与蛋白质定点偶联中的应用

在食品工业中,MTGase 可以实现蛋白质间的交联,从而改变食品的风味和蛋白质(酶)的功能,这种蛋白质交联是随机的、非定向的[38]。引入定向修饰可以改善修饰产物的均一性,这对于蛋白质修饰来说至关重要,均一性的修饰产物表现出优越的生物特性。为了克服这一问题,同样利用基因工程手段,将蛋白质或酶的活性中心之外的区域标记上一个 MTGase 识别的谷氨酰胺或者赖氨酸位点，这样人们可以将任何感兴趣的修饰基团添加到蛋白质上,而且这种修饰是定点和特异性的(图 5)[23]。譬如,Nagamune 等[39] 通过基因工程手段在细胞色素 P450 中引入带 Q 或 K 的短肽标签 (tag)，利用 MTGase 成功将另外 2 个功能性蛋白偶联到 P450 上,得到 P450 多功能酶;他们还将没有 MTGase 识别位点的野生型绿色荧光蛋白通过基因工程引入 MTGase 识别位点，利用 MTGase 将绿色荧光蛋白(GFP)与待检测蛋白核糖核酸酶 S 肽偶联,应用于蛋白质检测[40];利用同样的方法,可以将单结构域抗体片段结合到碱性磷酸酶用于酶联免疫测定[41]。另外,借助基因工程手段,MTGase 还可以实现酶固定

化,Goto 等[42]在碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase AP)的 N 端利用基因工程手段表达一个可以提供赖氨酸位点的短肽 MKHKGS,酪蛋白利用化学方法固定于聚丙烯树脂,然后利用 MTGase 将碱性磷酸酶与树脂固定化的酪蛋白连接,实现碱性磷酸酶的固定化。最后,利用这种方法还可以实现蛋白质的多聚化,Scheller[43]课题组将单结构域的抗体接入核糖核酸酶 S 肽标签后可以和肿瘤坏死因子形成二聚体或多聚体,这种多聚体比单聚体活性更高。上述这种利用基因工程手段引入 MTGase 修饰位点的方法,其优点是扩大了被修饰蛋白质的范围。

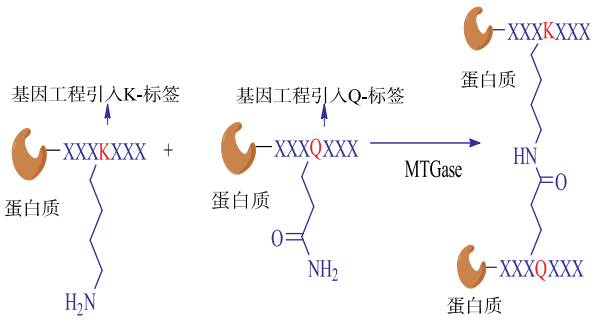


图 5　MTGase 通过基因工程引入识别标签介导蛋白质间的偶联

Fig. 5　Protein ligation mediated by MTGase through genetically encoded tag

2.3　MTGase 介导的蛋白质与聚合物之间的定点偶联

2.3.1　MTGase 介导的蛋白质与 PEG (poly-ethyleneglycol)定点偶联　聚乙二醇 PEG 通常用来修饰药物蛋白质和多肽,可以显著改善这些药物的体内半衰期,提高药物的稳定性和活性。在 PEG 末端通过化学方法引入氨基,可以模拟赖氨酸侧链氨基功能,然后利用 MTGase 实现蛋白质的 PEG 化。Sato[44]于 1996 年首次利用豚鼠肝来源的谷胺酰转氨酶实现了蛋白质的 PEG 修饰。之后,他们完善了这种修饰方法[45],改用 MTGase 将人白介素-2 单个活性位点 Q74 连接上 12×10^3 的 PEG,同时 PEG 另一端引入半乳糖残基(Gal_3),Gal_3 是肝细胞膜上去唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor ASGP-R)的配体,Gal3 的引入赋予白介素-2 靶向性,修饰后的药物半衰期延长,同时保持原有药物活性不变。

另外,Fontana[46-47]课题组利用 MTGase 对肌红蛋白和人生长激素 PEG 修饰进行了初步探索,但修饰后的药物均一性较差,因此,他们试图通过不同的方法改变这一缺陷。例如,人生长激素(hGH)虽然有 13 个谷氨酰胺,Pasut 等[48]研究发现,通过改变 MTGase 酶与底物的量,将 PEG 末端带上氨基可以定点连接至蛋白质的 Q141 位点,能够得到均一性较好的偶联体;另外还可以改变溶剂反应体系,Mero 等[49]以鲑降钙素(sCT)和人生长激素作为模式蛋白,在 MTGase 反应体系中添加不同比例的有机溶剂(DMSO,EtOH,MeOH,MeCN,TFE),在水/有机溶剂共溶剂系统中可以实现鲑降钙素和人生长激素的定点 PEG 修饰,这可能是因为溶剂改变了目的蛋白和酶的二级结构所导致的(图 6)[50]。

上述通过改变反应物的量或者溶剂反应体系策略虽然在一定程度能实现蛋白质的定点 PEG 化,但仍然无法做到精确控制。蛋白质上能够被修饰的谷氨酰胺或者赖氨酸位点相对于总的谷氨酰胺或者赖氨酸位点是比较少的,在许多蛋白质中这种能够被识别的修饰位点就只有 1 个或者 2 个,如果能够确定这些修饰位点就能够实现定点修饰而得到均一性的偶联体。Maullu 等[51-52]利用计算机信息学方法,通过理性设计,在人粒细胞集落刺激因子上找到定点修饰位点,实现了定向位点引入 PEG。

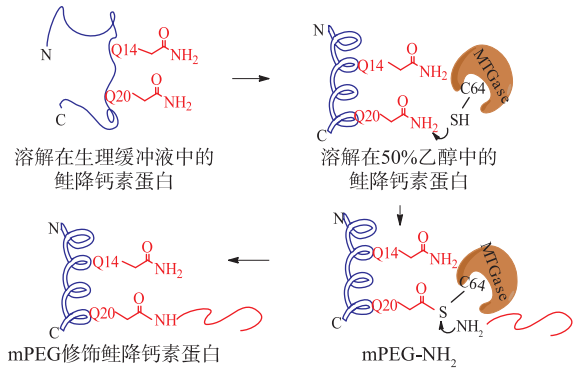


图 6　MTGase 介导的蛋白质定点 PEG 修饰

Fig. 6　MTGase-mediated site-specific protein PEGlation

2.3.2　MTGase 介导的蛋白质与 POZ(polyoxazoline)之间的定点偶联　虽然 PEG 修饰药物已经商品化并成为蛋白质药物修饰的金标准,但 PEG 具有诸如免疫反应、难清除等缺点,人们试图找到性能更好的多聚体修饰物。恶唑啉多聚体(POZ)是最近几年发现的另外一种水溶性、生物相容性优良的多聚体。在合成恶唑啉多聚体时,通过化学方法在终止末端引入功能性基团氨基,该恶唑啉多聚体能被

MTGase 识别并与人粒细胞集落刺激因子上的 Q 残基连接,形成蛋白-恶唑啉多聚体复合物[53]。这些复合物无论在体内还是体外实验中，与修饰前相比较,都表现出较高的生物活性。

2.4 MTGase 介导的蛋白质与糖类物质之间的定点偶联

利用 MTGase，还可以将寡聚糖偶联至一些食品类蛋白质上,一般是将葡萄糖胺作为酰胺基供体接至酪蛋白[54]、谷蛋白水解物上[55],从而改变这些蛋白质的特性,例如,利用壳寡糖对大豆蛋白进行糖基化，修饰后的大豆蛋白疏水性和乳化作用较低,乳剂稳定性提高,对水和油的结合能力提高[56]。

在修饰工业酶方面,Villalonga 等[57-59]利用 MTGase 对胰蛋白酶进行了环糊精（CD)、葡聚糖(DEX)、羧甲基纤维素(CMC)、聚蔗糖(FIC)等糖基化修饰,修饰后的胰蛋白酶在热稳定性、酶活性等方面均有改善；将氨基化葡聚糖通过 MTGase 偶联的方法同样应用于过氧化氢酶的修饰[60],相对于化学修饰，这种酶法修饰能够显著提高酶的活性,但是，由于每个过氧化氢酶偶联的葡聚糖数量较少,导致总体相对分子质量相对于 PEG 修饰后的相对分子质量较低，与 PEG 修饰后的过氧化氢酶比较,葡聚糖修饰后的过氧化氢酶的血清半衰期较短。

对药用蛋白质进行糖基化修饰的报道较少,药用蛋白质的糖基化可以提高药用蛋白质的半衰期以及生物利用度,例如,Ramos 等[61]首先探索了利用 MTGase 化学酶法合成神经糖肽的可行性，在此基础上,Sato 等[62]利用 MTGase 在胰岛素上实现了糖基化修饰，发现野生型胰岛素的 Q 很难进入 MTGase 活性中心,导致偶联效果不佳,他们将胰岛素 B 链的 N 端氨基酸 F 突变为 Q，然后利用 MTGase 引入乳糖(图 7),最后利用 α-2,6-siaT(a-2,6-sialyltransferase,唾液酸转移酶)引入唾液酸。由于细菌以及癌细胞表面糖型结构与正常哺乳动物细胞是不一样的,而且大多数细胞表面受体的配体含有糖基化结构[63-65],因此,基于 MTGase 的酰基转移反应还有望在糖疫苗研发、药用蛋白的靶向性方面发挥重要作用。

羟乙基淀粉(HES)由于具有水溶性较好,易于代谢，较好的生物相容性等优点，逐渐用来替代 PEG 修饰蛋白质和多肽药物。Besheer[66-67]课题组首次利用 MTGase 对蛋白质进行 HES 修饰,HES 首先引入 cbz-QG 和己二胺(HMDA),这样 HES 既可以作为酰基供体也可以作为酰基受体，再利用 MTGase 与酪蛋白偶联,形成 HES 修饰蛋白。

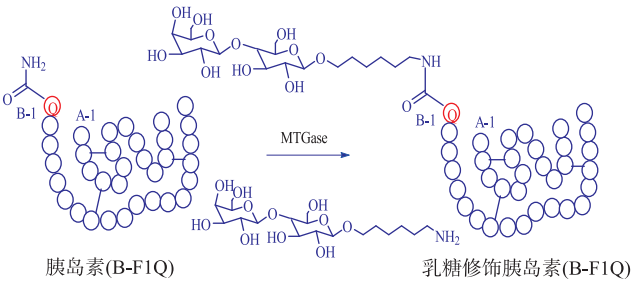


图 7 MTGase 介导的胰岛素定点糖基化修饰

Fig. 7 MTGase mediated site-specific insulin modification by oligosaccharides

2.5 其他应用

MTGase 可用于环肽的合成，传统环肽的合成是将线性肽首尾(或者侧链基团之间)化学连接,为了避免其他侧链基团的副反应,要求侧链基团全保护,酶法合成环肽避免了这一缺陷。Touati 等[68]以 MTGase 底物 WALQRPH 为出发点，在 C 端接入 GGG 连接臂和酰基受体 K（H-WALQRPHGGGKS-NH2)，实验证明 Q 的 N 端-1,-2 位的氨基酸对环肽形成至关重要，但是可以任意改变 Q 的 C 端序列。另外，他们以血管舒缓素 PK15 为例，证明了 MTGase 合成双环肽的可能性。

最后,MTGase 可用于蛋白质的脂质化修饰。Abe 等[69]通过基因工程在绿色荧光蛋白(EGFP)的 C

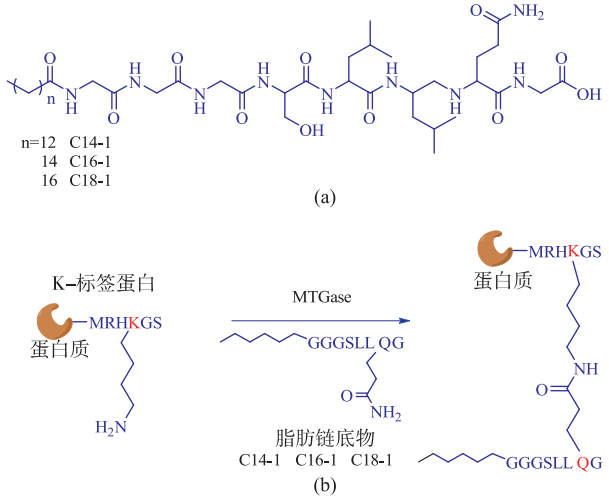


图 8 MTGase 介导的蛋白质定点脂质化修饰

Fig. 8 MTG mediated site-specific protein modification by lipid

端接入 K-Tag(MRHKGS)(图 8(b)),通过化学方法合成了不同长度的脂肪酸链修饰的七肽序列 GGGSLLQG(图 8(a))提供酰基供体。虽然野生型 EGFP 有多个赖氨酸和谷氨酰胺残基,但实验证明该蛋白质并不能被 MTGase 所识别[40];相反,C-端带有 K-Tag 的 EGFP 能顺利被 MTGase 识别,并与带有酰基供体的脂肪链反应,实现绿色荧光蛋白的定点脂质化修饰。

3 结 语

自从日本味之素公司首次从链霉菌属中分离到谷胺酰胺转氨酶以来,因其底物的宽泛性,广泛应用于食品类蛋白质的交联。近年来,通过基因工程手段在蛋白质的适当位置引入 MTGase 能够识别的 Q-Tag 或 K-Tag,利用化学和酶法相结合等手段,MTGase 介导的酰基转移反应已经逐渐发展成为蛋白质定点修饰的一个有效手段。特别是在抗体药物制备方面的应用,在提高药用蛋白质的稳定性、活性、半衰期等方面都取得了很好的进展。另外,这种修饰方法还可以用于对蛋白质标记,实现在体内追踪目的蛋白、生物医学造影等。但由于蛋白质上能够被修饰谷氨酰胺或者赖氨酸位点较少,该法不能应用于所有蛋白质,其普适性还有待进一步提高。同时,该法定点修饰蛋白质的效率还需要进一步提高,因此,利用酶工程手段改造 MTGase,进一步提高其催化效率也是以后研究的重点。综上所述,基于 MTGase 的酰基转移反应已经发展为一种高效的、高选择性的蛋白质连接和修饰方法,该方法在蛋白质药物研究中会发挥重要作用。

参考文献:

[1] HU J,GUO Y T,LI Y M. Research progress in protein post-translational modification[J]. **Chinese Science Bulletin**,2005,51(6):633-645.

[2] RASHIDIAN M,DOZIER J K,DISTEFANO M D. Enzymatic labeling of proteins:techniques and approaches[J]. **Bioconjugate Chemistry**,2013,24(8):1277-1294.

[3] GRIFFIN M,CASADIO R,BERGAMINI C M. Transglutaminases:nature's biological glues[J]. **Biochemical Journal**,2002,368(2):377-396.

[4] AUTUORI F,FARRACE M G,OLIVERIO S,et al. "Tissue" transglutaminase and apoptosis[J]. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**,1998,62:129-136.

[5] ABE S,YAMASHITA K,KOHNO H,et al. Involvement of transglutaminase in the receptor-mediated endocytosis of mouse peritoneal macrophages[J]. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**,2000,23(12):1511-1513.

[6] CHEN J S K,MEHTA K. Tissue transglutaminase:an enzyme with a split personality[J]. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**,1999,31(8):817-836.

[7] LIU S,DU G C,CHEN J. Chemical modification of transglutaminase for improving specific activity and thermal stability[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2015,34(11):1135-1140.(in Chinese)

[8] KANAJI T,OZAKI H,TAKAO T,et al. Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* sp. strain s-8112 [J]. **Journal of Biological Chemistry**,1993,268(16):11565-11572.

[9] YANG M T,CHANG C H,WANG J M,et al. Crystal structure and inhibition studies of transglutaminase from *Streptomyces mobaraense*[J]. **Journal of Biological Chemistry**,2011,286(9):7301-7307.

[10] ZOTZEL J,KELLER P,Fuchsbauer H L. Transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is activated by an endogenous metalloprotease[J]. **European Journal of Biochemistry**,2003,270(15):3214-3222.

[11] ZOTZEL J,PASTERNACK R,PELZER C,et al. Activated transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is processed by a tripeptidyl aminopeptidase in the final step[J]. **European Journal of Biochemistry**,2003,270(20):4149-4155.

[12] KASHIWAGI T,YOKOYAMA K,ISHIKAWA K,et al. Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*[J]. **Journal of Biological Chemistry**,2002,277(46):44252-44260.

[13] YOKOYAMA K,NIO N,KIKUCHI Y. Properties and applications of microbial transglutaminase[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2004,64(4):447-454.

[14] SUGIMURA Y,YOKOYAMA K,NIO N,et al. Identification of preferred substrate sequences of microbial transglutaminase from

Streptomyces mobaraensis using a phage-displayed peptide library[J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics**,2008,477(2):379-383.

[15] OTENG-PABI S K,KEILLOR J W. Continuous enzyme-coupled assay for microbial transglutaminase activity[J]. **Analytical Biochemistry**,2013,441(2):169-173.

[16] LEE J H,SONG C,KIM D H,et al. Glutamine (Q)-peptide screening for transglutaminase reaction using mRNA display[J]. **Biotechnology and Bioengineering**,2013,110(2):353-362.

[17] OHTSUKA T,SAWA A,KAWABATA R,et al. Substrate specificities of microbial transglutaminase for primary amines[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2000,48(12):6230-6233.

[18] NONAKA M,MATSUURA Y,MOTOKI M. Incorporation of lysine-and lysine dipeptides into α s1-Casein by Ca^{2+}-independent microbial transglutaminase[J]. **Bioscience,Biotechnology,and Biochemistry**,1996,60(1):131-133.

[19] KULIK C,HEINE E,WEICHOLD O,et al. Synthetic substrates as amine donors and acceptors in microbial transglutaminase-catalysed reactions[J]. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**,2009,57(1):237-241.

[20] GUNDERSEN M T,KEILLOR J W,PELLETIER J N. Microbial transglutaminase displays broad acyl-acceptor substrate specificity[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2014,98(1):219-230.

[21] LEE J H,SONG E,LEE S G,et al. High-throughput screening for transglutaminase activities using recombinant fluorescent proteins[J]. **Biotechnology and Bioengineering**,2013,110(11):2865-2873.

[22] ABE H,GOTO M,KAMIYA N. Protein lipidation catalyzed by microbial transglutaminase[J]. **Chemistry–A European Journal**,2011,17(50):14004-14008.

[23] TANAKA T,KAMIYA N,NAGAMUNE T. N-terminal glycine-specific protein conjugation catalyzed by microbial transglutaminase[J]. **FEBS Letters**,2005,579(10):2092-2096.

[24] TOMINAGA J,KAMIYA N,DOI S,et al. Design of a specific peptide tag that affords covalent and site-specific enzyme immobilization catalyzed by microbial transglutaminase[J]. **Biomacromolecules**,2005,6(4):2299-2304.

[25] OTENG-PABI S K,PARDIN C,STOICA M,et al. Site-specific protein labelling and immobilization mediated by microbial transglutaminase[J]. **Chemical Communications**,2014,50(50):6604-6606.

[26] CAPORALE A,SELIS F,SANDOMENICO A,et al. The LQSP tetrapeptide is a new highly efficient substrate of microbial transglutaminase for the site-specific derivatization of peptides and proteins[J]. **Biotechnology Journal**,2015,10(1):154-161.

[27] STROP P,DORYWALSKA M,RAJPAL A,et al. Engineered polypeptide conjugates and methods for making thereof using transglutaminase:US,WO2012059882[P]. 2012-09-05.

[28] ZOLOT R S,BASU S,MILLION R P. Antibody-drug conjugates[J]. **Nature Reviews Drug Discovery**,2013,12(4):259-260.

[29] WANG L,AMPHLETT G,BLÄTTLER W A,et al. Structural characterization of the maytansinoid-monoclonal antibody immunoconjugate,huN901-DM1,by mass spectrometry[J]. **Protein Science**,2005,14(9):2436-2446.

[30] JOSTEN A,HAALCK L,SPENER F,et al. Use of microbial transglutaminase for the enzymatic biotinylation of antibodies[J]. **Journal of Immunological Methods**,2000,240(1):47-54.

[31] JUNUTULA J R,RAAB H,CLARK S,et al. Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index[J]. **Nature biotechnology**,2008,26(8):925-932.

[32] SHEN B Q,XU K,LIU L,et al Conjugation site modulates the in vivo stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates[J]. **Nature Biotechnol**,2012,30(30):184-189.

[33] JEGER S,ZIMMERMANN K,BLANC A,et al. Site-specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase[J]. **Angewandte Chemie**,2010,49(51):9995-9997.

[34] STROP P,LIU S H,DORYWALSKA M,et al. Location matters:site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates[J]. **Chemistry & Biology**,2013,20(2):161-167.

[35] FARIAS S E,STROP P,DELARIA K. Mass spectrometric characterization of transglutaminase based site-specific antibody-drug conjugates[J]. **Bioconjugate Chemistry**,2014,25(2):240-250.

[36] DENNLER P,CHIOTELLIS A,FISCHER E,et al. Transglutaminase-based chemo-enzymatic conjugation approach yields homogeneous antibody-drug conjugates[J]. **Bioconjugate Chemistry**,2014,25(3):569-578.

[37] MINDT T L,JUNGI V,WYSS S,et al. Modification of different IgG1 antibodies via glutamine and lysine using bacterial and

human tissue transglutaminase[J]. **Bioconjugate Chemistry**,2008,19(1):271-278.
[38] BECHTOLD U,OTTERBACH J T,PASTERNACK R,et al. Enzymic preparation of protein G-peroxidase conjugates catalysed by transglutaminase[J]. **Journal of Biochemistry**,2000,127(2):239-245.
[39] HIRAKAWA H,KAMIYA N,TANAKA T,et al. Intramolecular electron transfer in a cytochrome P450cam system with a site-specific branched structure[J]. **Protein Engineering Design and Selection**,2007,20(9):453-459.
[40] KAMIYA N,TANAKA T,SUZUKI T,et al. S-peptide as a potent peptidyl linker for protein cross-linking by microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis*[J]. **Bioconjugate Chem**,2003,14(2):351-357.
[41] TAKAZAWA T,KAMIYA N,UEDA H,et al. Enzymatic labeling of a single chain variable fragment of an antibody with alkaline phosphatase by microbial transglutaminase[J]. **Biotechnology and Bioengineering**,2004,86(4):399-404.
[42] TOMINAGA J,KAMIYA N,DOI S,et al. An enzymatic strategy for site-specific immobilization of functional proteins using microbial transglutaminase[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,2004,35(6):613-618.
[43] PLAGMANN I,CHALARIS A,KRUGLOV A A,et al. Transglutaminase-catalyzed covalent multimerization of Camelidae anti-human TNF single domain antibodies improves neutralizing activity[J]. **Journal of Biotechnology**,2009,142(2):170-178.
[44] SATO H,IKEDA M,SUZUKI K,et al. Site-specific modification of interleukin-2 by the combined use of genetic engineering techniques and transglutaminase[J]. **Biochemistry**,1996,35(40):13072-13080.
[45] SATO H,HAYASHI E,YAMADA N,et al. Further studies on the site-specific protein modification by microbial transglutaminase[J]. **Bioconjugate Chemistry**,2001,12(5):701-710.
[46] FONTANA A,SPOLAORE B,MERO A,et al. Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase[J]. **Advanced Drug Delivery Reviews**,2008,60(1):13-28.
[47] MERO A,SPOLAORE B,VERONESE F M,et al. Transglutaminase-mediated PEGylation of proteins:direct identification of the sites of protein modification by mass spectrometry using a novel monodisperse PEG [J]. **Bioconjugate Chemistry**,2009,20(2):384-389.
[48] DA SILVA FREITAS D,MERO A,PASUT G. Chemical and enzymatic site specific PEGylation of hGH [J]. **Bioconjugate Chemistry**,2013,24(3):456-463.
[49] MERO A,SCHIAVON M,VERONESE F M,et al. A new method to increase selectivity of transglutaminase mediated PEGylation of salmon calcitonin and human growth hormone[J]. **Journal of Controlled Release**,2011,154(1):27-34.
[50] PASUT G,VERONESE F M. State of the art in PEGylation:the great versatility achieved after forty years of research[J]. **Journal of Controlled Release**,2012,161(2):461-472.
[51] MAULLU C,RAIMONDO D,CABOI F,et al. Site-directed enzymatic PEGylation of the human granulocyte colony-stimulating factor[J]. **FEBS Journal**,2009,276(22):6741-6750.
[52] SCARAMUZZA S,TONON G,OLIANAS A,et al. A new site-specific mono PEGylated filgrastim derivative prepared by enzymatic conjugation:production and physicochemical characterization[J]. **Journal of Controlled Release**,2012,164(3):355-363.
[53] MERO A,FANG Z,PASUT G,et al. Selective conjugation of poly(2-ethyl 2-oxazoline) to granulocyte colony stimulating factor [J]. **Journal of controlled release**,2012,159(3):353-361.
[54] JIANG S J,ZHAO X H. Transglutaminase-induced cross-linking and glucosamine conjugation of casein and some functional properties of the modified product[J]. **International Dairy Journal**,2011,21(4):198-205.
[55] GOTTARDI D,HONG P K,NDAGIJIMANA M,et al. Conjugation of gluten hydrolysates with glucosamine at mild temperatures enhances antioxidant and antimicrobial properties[J]. **LWT–Food Science and Technology**,2014,57(1):181-187.
[56] SONG C L,ZHAO X H. Structure and property modification of an oligochitosan-glycosylated and crosslinked soybean protein generated by microbial transglutaminase[J]. **Food Chemistry**,2014,163:114-119.
[57] VILLALONGA R,FERNANDZ M,FRAGOSO A,et al. Transglutaminase-catalyzed synthesis of trypsin-cyclodextrin conjugates:Kinetics and stability properties[J]. **Biotechnology and Bioengineering**,2003,81(6):732-737.
[58] VILLALONGA R,FERNANDZ M,FRAGOSO A,et al. Thermal stabilization of trypsin by enzymic modification with β-cyclodextrin derivatives[J]. **Biotechnology and Applied Biochemistry**,2003,38(1):53-59.
[59] VILLALONGA M L,VILLALONGA R,MARINIELLO L,et al. Transglutaminase-catalysed glycosidation of trypsin with

aminated polysaccharides[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**,2006,22(6):595-602.

[60] VALDIVIA A,VILLALONGA R,DI PIERRO P,et al. Transglutaminase-catalyzed site-specific glycosidation of catalase with aminated dextran[J]. **Journal of Biotechnology**,2006,122(3):326-333.

[61] RAMOS D,ROLLIN P,KLAFFKE W. Chemoenzymatic synthesis of neoglycopeptides:application to an α-Gal-terminated neoglycopeptide[J]. **The Journal of Organic Chemistry**,2001,66(9):2948-2956.

[62] SATO M,SADAMOTO R,NIIKURA K,et al. Site-specific introduction of sialic acid into insulin[J]. **Angewandte Chemie International Edition**,2004,43(12):1516-1520.

[63] DUBE D H,CHAMPASA K,WANG B. Chemical tools to discover and target bacterial glycoproteins[J]. **Chemical Communications**,2011,47(1):87-101.

[64] LONGWELL S A,DUBE D H. Deciphering the bacterial glycocode:recent advances in bacterial glycoproteomics[J]. **Current Opinion in Chemical Biology**,2013,17(1):41-48.

[65] ADIBEKIAN A,STALLFORTH P,HECHT M L,et al. Comparative bioinformatics analysis of the mammalian and bacterial glycomes[J]. **Chemical Science**,2011,2(2):337-344.

[66] BESHEER A,HERTEL T C,KRESSLER J,et al. Enzymatically catalyzed HES conjugation using microbial transglutaminase:proof of feasibility[J]. **Journal of Pharmaceutical Sciences**,2009,98(11):4420-4428.

[67] BESHEER A,HERTEL T C,KRESSLER J,et al. Enzymatically catalyzed conjugation of a biodegradable polymer to proteins and small molecules using microbial transglutaminase[J]. **Bioconjugation Protocols:Strategies and Methods**,2011,751:17-27.

[68] TOUATI J,ANGELINI A,HINNER M J,et al. Enzymatic cyclisation of peptides with a transglutaminase[J]. **Chem Bio Chem**,2011,12(1):38-42.

[69] ABE H,GOTO M,KAMIYA N. Protein lipidation catalyzed by microbial transglutaminase[J]. **Chemistry–A European Journal**,2011,17(50):14004-14008.

会　议　消　息

会议名称:国际纯粹与应用化学联合会第 13 届国际离子聚合会议

会议时间:2019 年 9 月 8–13 日

会议地点:北京市

主 办 方:中国化学会

承 办 方:1、北京化工大学;2、复旦大学

会议主题:离子聚合和其它活性聚合在大分子工程中的应用

大会主席:张树

联 系 人:张树

电子邮箱:zhangshu@mail.buct.edu.cn

电　　话:13810431655

地　　址:北京市朝阳区北三环东路 15 号