

植物金属蛋白酶的研究进展

易博^{1,2}, 黄蓓蓓², 陆倍倍^{1,2}, 余晓静², 陈万生² (1. 第二军医大学药学院生药学教研室, 上海 200433; 2. 第二军医大学长征医院药学部, 上海 200003)

摘要 植物金属蛋白酶调节植物的生长发育, 关系植物蛋白质的降解和修饰。植物金属蛋白酶的研究对于用生物工程的方法改良药用植物的品质和性状有重要意义。本文主要对近年来国际上关于植物金属蛋白酶的研究进展作一综述。

关键词 金属蛋白酶; 亮氨酸氨基肽酶; 间质加工肽酶; 多酚氧化酶

中图分类号: R282.71 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-0111(2006)01-0007-03

近来植物科学家发现, 在维持许多细胞功能包括代谢调控、细胞器发生、细胞周期监控、动态平衡保持和细胞凋亡等方面, 蛋白质水解是必需的^[1,2]。随着对泛素/蛋白酶体这一蛋白水解途径的研究深入^[3], 蛋白酶也受到越来越多的关注, 展现出令人向往的研究前景^[4-6]。蛋白酶按其催化机制可以分为六类, 其中金属蛋白酶在结构和功能上是最多样化的^[7]。植物基因组中 1%~5% 的基因编码金属蛋白酶, 对从分子水平上研究植物性状和品质的改良有着重要意义。且相对于微生物、动物和人体来说, 植物中金属蛋白酶的研究报道国内较少, 本文主要对国外关于植物金属蛋白酶的研究情况作一综述。

1 金属蛋白酶的特点和分类

金属蛋白酶除具有一般蛋白酶的特点之外, 其最大的特点是活性中心依赖于某种金属离子, 能够被金属络合剂强烈抑制。金属蛋白酶分布广泛, 各种不同来源的金属蛋白酶大多具有自身与众不同的特点, 应用潜力巨大。有报道从海洋细菌中得到一些特异的金属蛋白酶, 具有嗜低温或耐高温、耐有机溶剂、热敏感、耐碱等性质, 这些特性是食品工业和日用化工等领域急需的^[8]。基质金属蛋白酶 (MMPs) 家族是机体内重要的一类蛋白酶家族, 迄今为止至少发现有 19 种之多, 按作用底物不同主要分为五大类: ①胶原酶, 主要降解多种类型间质胶原和蛋白多糖的核心蛋白。②明胶酶, 降解明胶和 IV、V、VII、X 型基底膜胶原。③基质降解素, 降解弹性纤维、纤维连接蛋白、层粘蛋白等基质糖蛋白和蛋白多糖的核心蛋白。④膜型基质金属蛋白酶, 除能降

解细胞外基质, 还能活化其他基质蛋白酶胶原。⑤其他酶类^[9]。MMP 与许多疾病相关, 特别是在转移的肿瘤细胞中, 其表达量明显高于正常对照细胞, 而且其在肿瘤细胞中表达水平的高低与肿瘤细胞粘附力及肿瘤细胞游走浸润及转移关系密切, 在肿瘤侵袭转移过程中起重要作用^[10]。植物中的金属蛋白酶也广泛存在。如多酚氧化酶 (PPO), 早在 1895 年就被发现, 是植物体内普遍存在的一类铜结合酶。模式植物拟南芥基因组研究, 发现了金属蛋白酶 12 个不同族的 81 个基因^[7]。

2 金属蛋白酶的结构及植物组织分布

金属蛋白酶活性依赖的金属阳离子, 主要为二价阳离子, 最普遍的是锌离子, 也有铜、钴和锰离子, 其功能在于催化, 通过激活水分子亲核攻击断裂肽键^[11,12]。金属蛋白酶中大部分叫 zincins, 拥有一小段保守的共有序列 (HEXXH), 2 个组氨酸残基作为催化作用锌离子的配基, 谷氨酸残基作为常见的支点^[13]。根据蛋白质的性质和第 3 个锌离子配基所在位置, zincins 被分成有结构差别的 3 个族群: gluzincins (下游的谷氨酸残基作为蛋白质的第 3 个金属离子配基)、aspzincins (含天冬氨酸残基) 和 metzincins (含组氨酸或天冬氨酸残基)^[14]。还有一些金属蛋白酶叫 inverzincins, 因为在这些蛋白质序列中有一个方向插入了锌离子结合位点 (HXXEH)。

金属蛋白酶广泛存在于植物体的各种器官或组织中, 大部分植物幼嫩部分含量较多, 成熟部分含量较少。如多酚氧化酶存在于正常细胞的光合组织 (如叶绿体类囊体的囊泡) 和非光合组织质体 (如马铃薯块茎细胞的造粉体), 是一种质体酶, 在植物幼嫩部分含量较多^[15]。但也有例外, 1991 年在大豆叶中发现金属蛋白酶, 后来证明其与基质金属蛋白酶同源, 该酶只存在于成年叶子中。近来对拟南芥

作者简介: 易博 (1978-), 男, 硕士研究生。

通讯作者: 陈万生, E-mail: chenws@vnet.citiz.net.

中克隆出来的基质金属蛋白酶基因 At2 - MMP 进行研究,该基因在拟南芥幼嫩的根和叶中都有表达,且随着根、叶及花生长期龄的增长反转录表达量增高^[16]。

3 植物金属蛋白酶的生理功能

3.1 细胞生长与凋亡 亮氨酸氨基肽酶(LAPs)是植物中广泛存在的一种金属蛋白酶,序列及结构很保守^[17]。根据底物特异性比较实验表明,LAPs 可以有效切割 N 端的亮氨酸、精氨酸和蛋氨酸残基,但不能切割天冬氨酸和甘氨酸残基^[18]。由于 LAPs 对 N 端氨基酸残基的影响("N - end - rule"),植物中的 LAPs 可能对蛋白半衰期具有重要的调节作用^[19],关系细胞的生长和凋亡。另根据研究发现,对于承担死亡和加强蛋白质周转的细胞,LAPs 能促进其碳源和氮源的流通,对病原体攻击和外界刺激有响应值,可导致植物体内代谢程序一定程度的重排^[20]。有实验表明,LAPs 在茉莉酸诱导植物的衰老进程中,也起着相似的作用^[21]。

Golladack 等从拟南芥中克隆出 5 条编码基质金属蛋白酶的基因,对其中一条 At2 - MMP 基因进行功能研究,发现拟南芥 At2 - MMP 突变体植株与野生型植株相比,嫩枝的抽条以及根、叶和枝的生长被抑制,开花时间推迟,并观察到叶中的叶绿素降解迅速,植物出现早衰^[16]。

3.2 叶绿体蛋白修饰与降解 植物中的金属蛋白酶包括肽链外切和内切酶,在许多不同的亚细胞部位,只有降解性和高度特异性加工功能。植物叶绿体中蛋白质非常丰富,由细胞质中合成的前体蛋白,翻译后转运得到。前体蛋白的运输依赖氨基末端的前导信号——前导肽(transitpeptide),它被蛋白水解后离开质体间质。由于叶绿体对光合作用、植物发育、生物合成能力都具有重要作用,前导肽的裂解很可能是植物细胞中最重要的翻译后蛋白质修饰^[22]。前导肽的切除是由基质加工蛋白酶(SPP)催化的,SPP 是一类可溶性金属蛋白酶,与胰岛素降解酶和线粒体 β 亚基加工肽酶相似^[23]。

前体蛋白加工至少涉及三个步骤。前体蛋白最初的识别不依赖 SPP 活性,而依赖蛋白酶 N 端结构域和前导肽 C 端 10 ~ 15 个残基的相互作用。在第 1 个内切酶水解反应中,成熟蛋白被释放,而前导肽仍与 SPP 结合。第 2 个裂解反应破坏了前导肽 C 端结合位点,亚碎片被释放。两个水解反应都依赖 HXXEH 锌结合结构与 SPP 氨基端相近^[23]。拟南芥中单个 SPP 基因的反义抑制表明,SPP 是叶绿体蛋白质运输器的基本组成部分,对叶绿体生物发生和

植物生存是必需的^[24]。

3.3 抗病虫害 植物对病原菌的防御系统,最后一道防线是通过诱导一些防御相关蛋白(如多酚氧化酶 PPO)的形成或增加其活性来获得的。有许多实验表明 PPO 活性与植物抗病相关。如真菌感染后的植株,其 PPO 活性明显增加,且从感染部位到未感染区域的边缘,PPO 活性有一个明显的梯度^[25];转入反义 PPO 基因或亲缘关系较近的植物的 PPO 基因时,转基因植物中的 PPO 的含量下降 40%,且不能被诱导,从而使植株产生 HR(hypersensitive response)^[26];转入强启动子上调 PPO 表达的植株,有更强的抗病虫害的能力。

PPO 为铜离子依赖的金属蛋白酶,能催化羟基化为 O - 二酚,也能将 O - 二羟基酚氧化为相应的 O - 醌。PPO 防御病虫害的作用,通过 O - 醌共价结合修饰亲核氨基酸,降低植物蛋白的营养价值,形成抗营养机制;或与昆虫肠胃里的消化酶结合使酶失活,减慢昆虫的生长发育并促使其死亡。另外醌本身有一定的毒性,可对抗害虫^[15]。现已发现,在水稻、烟草、棉苗和苹果自身对抗各种病菌及昆虫的过程中,PPO 起着重要作用。

4 结语

植物金属蛋白酶性质特异,分布广泛,具有诸多生理功能,特别是调节植物细胞的生长与凋亡和对叶绿体蛋白质的修饰和降解,对于药用植物的品质改善和性状改良具有重要的意义。抗病虫害金属蛋白酶的研究,则对中药现代化实现栽培无公害无农药残留的绿色中药提供了极具现实意义的实现途径。目前对于植物金属蛋白酶的研究,主要还集中在植物的发生发育机制及基本功能原理的探讨和研究上,但随着越来越多科学家的关注,植物金属蛋白酶研究将进一步向应用方面迈进。

参考文献:

- [1] Beers EP, Jones AM, Dickerman AW. The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in Arabidopsis [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65 (1): 43.
- [2] Moberg P, Stahl A, Bhushan S, et al. Characterization of a novel zinc metalloprotease involved in degrading targeting peptides in mitochondria and chloroplasts [J]. *Plant Journal*, 2003, 36 (5): 616.
- [3] Vierstra RD. The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins [J]. *Trends In Plant Science*, 2003, 8 (3): 135.
- [4] Sullivan JA, Shirasu K, Deng XW. The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2003, 4 (12): 948.

- [5] Dharmasiri N, Estelle M. Auxin signaling and regulated protein degradation [J]. *Trends In Plant Science*, 2004, 9 (6): 302.
- [6] Fujinaga M, Cherney MM, Oyama H, *et al.* The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum* [J]. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 2004, 101 (10): 3364.
- [7] Schaller A. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases [J]. *Planta*, 2004, 220 (2): 183.
- [8] 荆谷,冯静,孔健,等.微生物金属蛋白酶的研究进展[J]. *生物工程进展*, 2002, 22(1): 61.
- [9] 侯振江,张宗英.基质金属蛋白酶在肝癌研究中的进展[J]. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 2005, 26(8): 517.
- [10] 陆振华,张朝霞,李喆.人基质金属蛋白酶[J]. *新疆医学*, 2000, 30(1): 39.
- [11] Puente XS, Lopez-Otin C. A genomic analysis of rat proteases and protease inhibitors [J]. *Genome Research*, 2004, 14 (4): 609.
- [12] Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidase inhibitors [J]. *Biochemical Journal*, 2004, 378: 705.
- [13] Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling [J]. *Trends in Genetics*, 1990, 6: 121.
- [14] Gomis-Ruth FX. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases [J]. *Molecular Biotechnology*, 2003, 24 (2): 157.
- [15] 王曼玲,胡中立,周明全,等.植物多酚氧化酶的研究进展[J]. *植物学通报*, 2005, 22 (2): 215.
- [16] Golldack D, Popova OV, Dietz KJ. Mutation of the matrix metalloproteinase At2-MMP inhibits growth and causes late flowering and early senescence in *Arabidopsis* [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 (7): 5541.
- [17] Bartling D, Weiler EW. Leucine aminopeptidase from *Arabidopsis thaliana*-molecular evidence for a phylogenetically conserved enzyme of protein-turnover in higher-plants [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1992, 205 (1): 425.
- [18] Gu YQ, Walling LL. Specificity of the wound-induced leucine aminopeptidase (LAP-A) of tomato-Activity on dipeptide and tripeptide substrates [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267 (4): 1178.
- [19] Varshavsky A. The N-end rule: Functions, mysteries, uses [J]. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 1996, 93 (22): 12142.
- [20] Gu YQ, Holzer FM, Walling LL. Overexpression, purification and biochemical characterization of the wound-induced leucine aminopeptidase of tomato [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 263 (3): 726.
- [21] Herbers K, Prat S, Willmitzer L. Functional-analysis of a leucine aminopeptidase from *Solanum tuberosum* L [J]. *Planta*, 1994, 194 (2): 230.
- [22] Richter S, Lamppa GK. Determinants for removal and degradation of transit peptides of chloroplast precursor proteins [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 (46): 43888.
- [23] Vandervere PS, Bennett TM, Oblong JE, *et al.* A chloroplast processing enzyme involved in precursor maturation shares a zinc-binding motif with a recently recognized family of metalloendopeptidases [J]. *Proceedings of the National Academy of sciences of The United States of America*, 1995, 92 (16): 7177.
- [24] Zhong R, Wan JX, Jin RG, *et al.* A pea antisense gene for the chloroplast stromal processing peptidase yields seedling lethals in *Arabidopsis*: survivors show defective GFP import in vivo [J]. *Plant Journal*, 2003, 34 (6): 802.
- [25] Thygesen PW, Dry IB, Robinson SP. Polyphenol oxidase in potato [J]. *Plant Physiology*, 1995, 109: 525.
- [26] Partington JC, Smith C, Paul BG. Changes in the location of polyphenol oxidase in potato tuber during cell death in response to impact injury: comparison with wound tissue [J]. *Planta*, 1999, 207: 449.

收稿日期:2005-11-30

L-脯氨酸作为手性催化剂在不对称 aldol 反应中的应用进展

赵庆杰,胡宏岗,宋 琰,吴秋业(第二军医大学药学院有机化学教研室,上海 200433)

摘要 L-脯氨酸是一种结构简单的有机小分子,近年来,L-脯氨酸用于催化不对称 aldol 反应的报道层出不穷,已成为合成界的一大研究热点,本文综述了近年来 L-脯氨酸用于催化不对称 aldol 反应的研究进展。

关键词 L-脯氨酸;aldol 反应;催化;机理

中图分类号:O643.3

文献标识码:A

文章编号:1006-0111(2006)01-0009-05

1 前言

一直以来,简单小分子能否作为不对称有机合成反应中发挥重要作用的手性催化剂是化学家们十

分关注和致力探索的论题,其原因是多方面决定的,首先,有机小分子经济易得,一旦此类反应得探索取得成功,并且获得应用,这对有机合成界和医药化工界的影响将是不可估量的。其次,由于催化剂的存在,使得此类反应的产率较高,反应的条件相对温和,其应用前景十分光明^[1]。

作者简介:赵庆杰,硕士研究生,从事药物合成研究。

通讯作者:吴秋业, E-mail: Qywu@smmu.edu.cn.