

植物体中硒的生理学、生物化学及分子生物学

PHYSIOLOGY, BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY OF SELENIUM IN PLANTS

周志刚

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

本文结合植物体中硒的代谢途径概述硒的生理学及生物化学作用,并以现代生物技术为依据在分子水平上阐述硒结合蛋白质生物合成的分子机理。

1 植物体中硒的生物学及其生物化学

硒酸盐和硫酸盐的竞争性吸收是研究植物体硒-硫拮抗的一个主要方面。Leggett 和 Epstein 成功地将通常用于研究酶作用的 Michaelis-Menten 方程应用于大麦根部对离子运输的研究,发现硒酸盐和硫酸盐离子以相同的亲和力结合于根部细胞膜上的相同位点,从而表现为竞争性结合,这个结合位点为载体或渗透酶,经过它主动吸收硒酸盐^[13]。人们曾多次观察到黄芪(*Astragalus crocotalariae*)根部对硒酸盐的主动吸收过程可被呼吸抑制剂(如叠氮化物和二硝基苯酚)或低温所抑制。研究大麦离体根对硫酸盐与硒酸盐的相对吸收,结果表明两种元素在大麦根中的不同主要是吸收后的代谢途径而不是吸收过程。小球藻(*Chlorella vulgaris*)对硒酸盐和硫酸盐的吸收也是竞争性的^[19]。

植物对亚硒酸盐的吸收比硒酸盐慢得多:当用硒酸盐饲喂西红柿时,其木质部渗出液中硒的含量比外部培养基的高 6~13 倍;而改用亚硒酸盐时,总比培养基的低^[1]。表明该吸收可能是被动的过程,尽管也有部分代谢途径可被抑制剂阻止^[19]。植物吸收硒酸盐和亚硒酸盐后自根部向上运输也有不同,例如西红柿运输硒的量在供给硒酸盐时比供给亚硒酸盐多两倍^[1]。硒被植物体吸收后,在地上部分通过韧皮部迅速重新分布。

对积聚和非积聚植物的整个植株或离体根部进行实验的结果证明,根对硒酸盐和亚硒酸盐的吸收并没有什么不同,这表明两种类型的植物在吸收硒后不同的代谢途径有待进一步探讨。

植物体内硒酸盐的同化大多被认为是沿着硫酸盐的同化途径进行的。自酵母中分离的 ATP 硫酸化酶体外可催化硒酸盐形成腺苷-5'-磷酸硒酸,类同于硫酸盐同化的第一步^[5];从 *Astragalus* 一植物中分离出同

样的酶均能催化依靠硫酸盐和硒酸盐的 $PP_i + ATP$ 的交换,但没能合成腺苷-5'-磷酸硒酸,后来在另一种硒积聚植物 *Neptunia amplicaulis* 中得到证实。亚硒酸盐与亚硫酸盐在体内可能沿不同的途径分别被还原成硒化物和硫化物:亚硒酸盐可能是通过光偶联 GSH 还原酶进行的^[16](图 1)。硒结合形成硫酸酯一类的类似物至今还没有发现,但硒与多糖的结合可能是硒酸酯取代了硫酸酯;硒与脂类的结合可能也不是代谢性的,而是形成一种非共价键结合的含硒脂类。有关硒和硫的同化途径,至今还有许多问题有待解决。

植物中发现了半胱氨酸(Cys)和甲硫氨酸(Met)的硒类似物(表 1),其中硒代半胱氨酸([Se]Cys)和硒代甲硫氨酸([Se]Met)都是蛋白质肽链中的组成部分^[7]。在积聚和非积聚植物中,[Se]Cys 的合成类似 Cys 的合成途径^[16](图 1),但 [Se]Met 的合成途径还不清楚。这两种类似物都不能以游离态的形式存在,但 Cys 和 Met 可以较低水平存在于大部分的组织中。植物中非蛋白组分的硒代氨基酸及其作用吸引了相当多的人去研究,在此不一一列举,有关这些非蛋白硒代氨基酸的合成也普遍地被认为是沿着硫氨基酸的合成途径进行的,但只有 Se-甲基硒代半胱氨酸得到实验的证实。

某些硒积聚植物(例如 *Astragalus racemosus*)在野外生长时能散发出类似大蒜的特殊气味,这是由于存在一些挥发性硒化合物,其中一种被证明为二甲基二硒醚^[8]。非积聚植物,例如苜蓿、卷心菜、向日葵、菠菜等,也能产生挥发性硒化合物,其中卷心菜的一种化合物即是二甲基硒醚。不仅如此,在植物组织的干燥过程中也有挥发性硒化合物产生,从而使其他的植物自空中也能吸收到硒^[15]。挥发性硒化合物产生的量与培养基中的硒化合物的形式有关,卷心菜叶子在亚硒酸盐中培养所释放的挥发性硒化合物比在硒酸盐中培养

中国科学院海洋研究所海洋调查报告第 3063 号。

收稿日期:1996 年 4 月 25 日

多 10~16 倍^[15]。

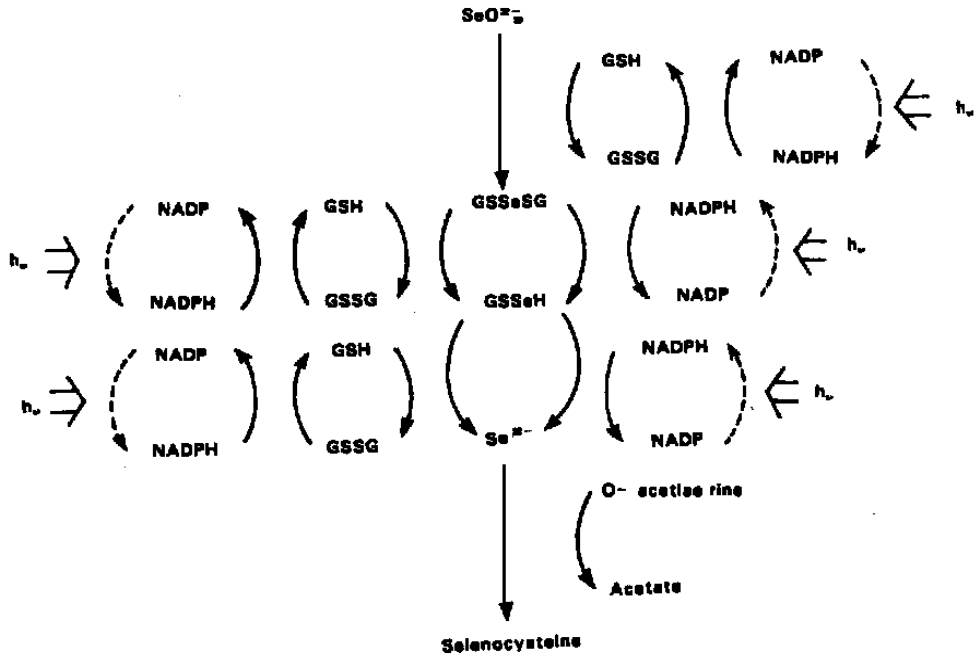


图 1 SeO_4^{2-} 通过植物叶绿体中光偶联 GSH 还原酶结合于硒代半胱氨酸的可能途径

表 1 植物中存在的有机硒化合物

分子式	名称
$\text{HSe-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$	Selenocysteine
$\text{CH}_3\text{-Se-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$	Selenomethionine
$\text{CH}_3\text{-Se-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$	Se-methylselenocysteine
$(\text{CH}_3)_2\text{-Se}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$	Se-methylselenomethionine
$\text{HOOC-CH(NH}_2\text{)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Se}$ $\text{HOOC-CH(NH}_2\text{)-CH}_2$	Selenocystathionine
$\text{HOOC-CH(NH}_2\text{)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-NH}$ $\text{CH}_3\text{-Se-CH}_2\text{-CH-COOH}$	γ -Glutamyl-Se-methylselenocysteine
$\text{HOOC-CH(NH}_2\text{)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Se}$	Selenohomocystine
$\text{HOOC-CH(NH}_2\text{)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Se}$	Selenohomocystine
$\text{CH}_3\text{-CH=CH-Se-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$ O	Se-acrylselenocysteine
$\text{CH}_3\text{-Se-CH}_3$	Dimethylselenide
$\text{CH}_3\text{-Se-Se-CH}_3$	Dimethyldiselenide

2 硒的分子生物学理论

尽管硒成为生命科学研究对象的时间可追溯到

19 世纪 60 年代,但硒的生物化学研究真正开始于 1973 年由 Rotruck 等人发现红细胞谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-POD)(EC 1.11.1.9)是含硒酶^[18],在这短短

的 20a 时间内, 硒的生物化学、分子生物学研究已取得了令人瞩目的进展。继这一发现之后, 人们从哺乳动物中还发现硒为多种酶所需, 例如磷酸氢过氧化物谷胱甘肽过氧化物酶, 人血浆 GSH-POD, I 型碘甲状腺素 5' 脱碘酶等; 此外, 还从不同动物组织中分离和鉴别出一系列功能尚未明确的含硒蛋白; 微生物中含硒酶的研究也有许多新的发现。随着分子生物学的发展和在生物化学研究领域中的应用, 使得人们对硒的生物化学本质有了更深刻的认识, 其中遗传基因 [Se]Cys (第 21 种氨基酸) 密码子 UGA 的发现^[4], 为经典的生物化学增添了丰富的内容, 从而也使硒的生物化学研究进入了一个新的阶段。

表 2 含硒蛋白质的分类

分类	
I	[Se]-Specific Proteins
	Glutathione peroxidase
	Formate dehydrogenase
	[NifSe]Hydrogenase
	Selenoprotein-P
II	Glycine reductase
	[Se]Met-Specific Proteins
	Thiolase
	β -Galactosidase
III	Muscle proteins
	[Se]Cys-Specific Proteins
	β -Globin
IV	Yeast proteins
	Se-binding Proteins
	[Se]-Fatty acid binding proteins
	Xanthine dehydrogenase
	130kD Plasma Se-binding proteins
77kD Mitochondrial Se-binding proteins	

与此同时, 硒对植物的作用机理研究也日趋完善, 但植物细胞中 GSH-POD 的存在仍然意见分歧。早期的研究表明, GSH-POD 只存在哺乳动物细胞中, 后来虽然在玉米、菠菜等细胞的粗提液中检测到该酶的活性, 但由于在分离纯化过程中不稳定而没有得到定性研究; 在蓝藻粘球藻 (*Gloeocapsa* sp. LB795) 和极大螺旋藻 (*Spirulina maxima*) 的粗提液中也检测到该酶的存在^[2, 23], 而在别的蓝藻如灰色念珠藻 (*Nostoc muscorum*) 和聚球藻 (*Synechococcus* 6311) 以及其他的高等植物中没有发现到这种酶的活性; 近来对高等植物组织培养的细胞和一种绿藻莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 细胞进行研究, 分离纯化得到

GSH-POD^[6, 22], 并把它与哺乳动物的 GSH-POD 作了比较, 发现两者理化性质很相似, 说明植物细胞中也存在依赖硒的 GSH-POD。不过, 在裸藻 (*Euglena gracilis*) 中又发现另一类不依赖硒的 GSH-POD 的存在^[17], 这一点与哺乳动物的不一样。另外, 在植物中还发现其他的含硒蛋白质。根据硒结合到蛋白中的前体和代谢途径的不同, 将含硒蛋白分成四类(见表 2)。

I 型是最重要的硒蛋白, 硒以 [Se]Cys 的形式结合到蛋白上, 但 Se 是协同转运的, 即以硒化物 (HSe-) 和丝氨酸 (Ser) 作为前体, 形成一种中间产物 tRNA^{Set}_{UGA}, 通过密码子 UGA 特异性地结合到肽链的相应位置。II 型硒是以 [Se]Met 的形式形成中间产物 [Se]Met-tRNA^{Met}, 通过 Met 密码子特异地结合到正在合成的肽链上。与此相同的 III 型, 硒以 [Se]Cys 形式形成 [Se]Cys-tRNA^{Cys}, 通过 Cys 密码子特异地结合到正在合成的肽链上, 这两种类型在蛋白质中的结合都依赖细胞中 [Se]Met/Met 或 [Se]Cys/Cys 的比值。最后一种 IV 型是硒结合蛋白, 硒紧紧地与蛋白结合以至在分离纯化过程中形成不同的含硒峰组分, 硒的结合可能是在翻译后结合到肽链中的氨基酸残基上, 或者是其他不明的修饰结果。

自上述的讨论可知, 生物体中硒主要是以 [Se]Cys 的形式存在于蛋白中, 那么它是如何进入蛋白的?

早在 1975 年, Young 等人就从大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中发现了含硒 tRNA 的存在, 到 1982 年, Hawkes 等从大鼠肝切片中证实 [Se]Cys 能键合在一种特异的 tRNA 上^[11]。但 Sunde 等人的研究表明, 硒的无机形式比 [Se]Cys 更易进入 GSH-POD, 而且他们用同位素标记氨基酸的结果证明, GSH-POD 中的 [Se]Cys 的碳架是来自 Ser 而不是 [Se]Cys^[21]。

1986 年, Chambers 等人采用克隆技术, 得到小鼠细胞 19kD GSH-POD 的 cDNA 顺序, 发现与 47 号氨基酸残基 (即 [Se]Cys 残基) 相对应的密码子是 TGA^[4], 此后相继从人、牛、大鼠的 GSH-POD 基因以及 *Escherichia coli* 甲酸脱氢酶的基因中均得到同样的结果。Zinoni 等人将 *E. coli* 甲酸脱氢酶的 *fdhF* 基因与 *lacZ* 基因在质粒 pFM 54 中重组发现^[24], 在培养基中硒减少时, *fdhF-lacZ* 的 RNA 产物减少, 当培养基中不含硒时, 转录就终止在肽链的 140 号密码子 UGA 处。而在 *E. coli* 和鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 无甲酸脱氢酶活性的突变株中, [Se]Cys 不能进入多肽链; 当用 UCA 代替 UGA 时, 则 [Se]Cys 不能结合到 *fdhF* 产物中, 而用 UGC 和 UGU 代替 UGA 时, 则 [Se]Cys 的结合量显著减少; 在这些突变

株中, 硒的缺乏不再阻止翻译, 但甲酸脱氢酶的活力下降 75%。以上事实说明在蛋白质的合成过程中, [Se]Cys 并非是翻译后修饰所产生的。

在 *Escherichia coli* 中能携带 [Se]Cys 并识到 UGA 的 tRNA 的发现是 [Se]Cys 进入蛋白质合成的强有力证据^[14]。这种特殊的 tRNA 是一种称为 *selC* (以前称 *fdhC*) 基因的产物, 含有 233bp, 不存在可编码蛋白的开读框结构, 其中有一个典型的由 95 个碱基组成的三叶草型 tRNA: 它含有一个 22 个碱基的 D-噁

噻, 可以与 mRNA 上的 UGA 配对的反密码子 UCA, 氨基酸臂比其它 tRNA 多一对碱基, 并能在其他所有 tRNA 含有相同碱基的位置上发生变动。Leinfelder 等人发现这个 tRNA 不能携带培养基中直接供给的游离 [Se]Cys, 考虑到 Sunde 等人的研究结果 (即 [Se]Cys 的碳架来自 Ser)^[21], 他们认为蛋白质中的 [Se]Cys 残基可能是由 Ser 上的 -OH 被硒取代而来, 后来被实验证实^[20]。

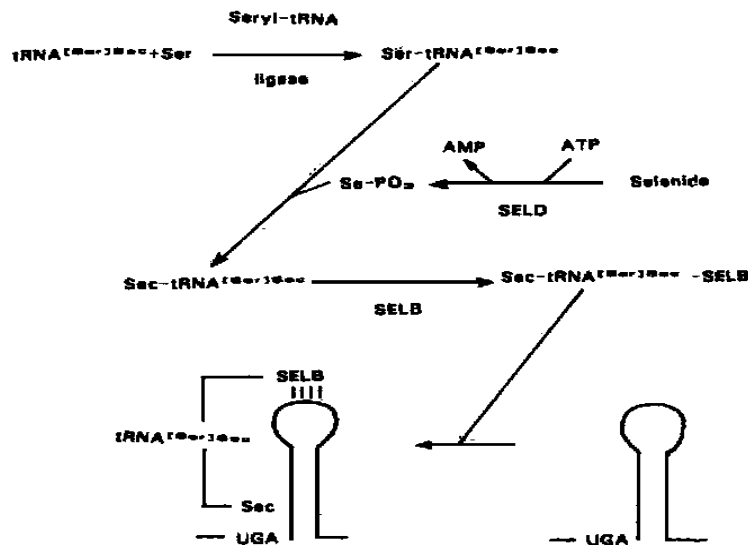


图 2 原核生物 [Se]Cys 的合成和进入蛋白质的模式

经过一系列研究, Burk 等人提出了原核生物 [Se]Cys 的合成和进入硒蛋白的机理^[3] (图 2)。这个独特结构来自 *selC* 基因的 tRNA 既可以与 Ser 结合, 也可以连接 [Se]Cys, 为了区别其他 tRNA^{Ser}, Lee 等人定义它为 tRNA^{[Ser]Sec}, 它在丝氨酰-tRNA 连接酶 (seryl-tRNA ligase) 的作用下, 与 Ser 反应形成 seryl-tRNA^{[Ser]Sec}, 携有 Ser 的 tRNA^{[Ser]Sec} 能与 [Se]Cys 合成酶 (selenocysteine synthase) 键合, 该酶是 *selA* 基因产物, 其分子量为 50kD, 在它的作用下, 连接在 tRNA^{[Ser]Sec} 上 Ser 的侧链氧被硒取代。

在 [Se]Cys-tRNA^{[Ser]Sec} 的合成过程中还需要另一种蛋白即 *selD* 基因产物, 它的分子量为 37kD, 含有 7 个 Cys 残基, 其中第 17 号 Cys 残基为催化活性所必需的, 因此以又被称为 SELD 酶, 在还原性条件下, 它催化 NaSeH 与 ATP 反应生成硒授体分子^[12]。

形成的 [Se]Cys-tRNA^{[Ser]Sec} 从 [Se]Cys 合成酶中释放出来, 并键合到一个特殊的延长因子 SELB 上。

SELB 蛋白是 *selB* 基因的产物, 分子量约为 68kD^[9], 它由两部分组成: 一个 43kD 的部分类似 EF-Tu, 另一部分约 25kD, 为 SELB 特有, 它能识别 [Se]Cys-tRNA^{[Ser]Sec}, 并能键合到硒蛋白的 mRNA 的发夹结构上。把这个 [Se]Cys-tRNA^{[Ser]Sec}-SELB 复合物依附在发夹结构上, 使得 [Se]Cys 更容易进入蛋白质。同时, 它可能具有把 [Se]Cys-tRNA^{[Ser]Sec} 带到 UGA 码邻近, 阻止释放因子 2 (RF₂) 接近核苷酸 A 位, 而不让 UGA 翻译为终止码。

原核生物的 [Se]Cys 的生物合成和进入蛋白质的分子机理已接近明了, 参与该过程的 4 个基因: *selA*, *selB*, *selC* 和 *selD* 已分别从产生甲酸脱氢酶的 *E. coli* 中分离纯化, 并已测得它们产物的一级结构, 相应的功能也已确定^[9, 12, 14]。至于真核生物 [Se]Cys 的合成途径知之甚少, 但目前也已得到一些证据^[10]。在此需说明的是上述机理只适用 [Se]Cys 通过密码子 UGA 特异地进入硒蛋白, 对于其他含硒蛋白的合成, 硒的进入可

能采用另外不同的途径,如通过 Cys 或 Met 的密码子、硫代谢途径、翻译后的修饰等,所有这些都待进一步完善。

参考文献

- [1] Asher, C. J. , G. W. Butler, P. J. Peterson, 1977. *J. Exp. Bot.* 28: 279-291.
- [2] Bozum, S. R. D. , J. R. Gallon, 1979. *J. Gen Microbiol.* 111: 313-326.
- [3] Burk, R. F. , K. E. Hill, 1993. *Annu. Res. Nutr.* 13: 65-81.
- [4] Chambers, I. , J. Frampton, P. Goldfarb, N. Affara, W. McBain, P. R. Harrison, 1986. *EMBO J.* 5: 1 221-1 227.
- [5] Dilworth, G. L. , R. S. Bandurski, 1977. *Biochem. J.* 163: 521-529.
- [6] Drotar, A. , P. Phelps, R. Fall, 1985. *Plant Sci.* 42: 35-40.
- [7] Eustice D. G. , I. Foster, F. J. Kull, A. Shrift, 1980. *Plant Physiol.* 66: 182-186.
- [8] Evans, C. S. , C. J. Asher, C. M. Johnson, 1968. *Aust. J. Biol. Sci.* 21: 13-20.
- [9] Forchhammer, K. K. P. Rucknagel, A. Bock, 1990. *J. Biol. Sci.* 265: 9 346-9 350.
- [10] Hatfield, D. L. , B. J. Lee, N. M. Price, T. C. Stadtm an, 1991. *Mol. Microbiol.* 5: 1 183-1 186.
- [11] Hawkes, W. C. , D. E. Lyones, A. L. Tappel, 1982. *Biochim. Biophys. Acta* 699: 183-191.
- [12] Kim, I. Y. Z. Veres, T. C. Stadtm an, 1992. *J. Biol. Chem.* 267: 19 650-19 654.
- [13] Leggett, J. E. , E. Epstein, 1956. *Plant Physiol.* 31: 222-226.
- [14] Leinfelder, W. , E. Zehelein, M. A. Mandrand-Berthelot, A. Bock, 1988. *Nature* 331: 723-725.
- [15] Lewis, B. G. , C. M. Johnson, T. C. Broeyer, 1974. *Plant Soil* 40: 107-118.
- [16] Ng, B. H. , J. W. Anderson, 1979. *Phytochem.* 18: 573-580.
- [17] Overbaugh, J. M. , R. Fall, 1985. *Plant Physiol.* 77: 437-442.
- [18] Rotruck, J. T. , A. L. Pope, H. E. Ganther, A. B. Swanson, D. G. Hateman, W. G. Hoekstra, 1973. *Science* 179: 588-590.
- [19] Shrift, A. , J. M. Ulrich, 1969. *Plant Physiol.* 44: 893-896.
- [20] Stadtm an, T. C. , J. N. Davis, E. Zehelein, A. Bock, 1989. *BioFactors* 2: 35-44.
- [21] Sunde, R. A. , J. K. Evenson, 1987. *J. Biol. Chem.* 262: 933-937.
- [22] Yokota, A. , S. Shigeoka, T. Onishi, S. Kitaoka, 1988. *Plant Physiol.* 86: 649-651.
- [23] Zhou, Z. G. Z. L. Liu, H. J. Chu, 1995. *J. Phycol. (Suppl.)* 31: 17.
- [24] Zinoni, F. , A. Birkm ann, T. C. Stadtm an, A. Bock, 1986. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4 650-4 654.