

酚氧化酶研究概况 II —— 基因结构及其系统演化

ADVANCE ON THE STUDY OF PHENOLOXIDASE II —— GENE STRUCTURE AND ITS PHYLOGENETICS

李国荣^{1,2} 张士瑾¹ 李红岩¹ 王昌留¹⁽¹⁾ 中国海洋大学生命学院 青岛 266003)⁽²⁾ 山东师范大学生物系 济南 250014)

中图分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 1000-3096(2003)05-0008-03

基因克隆、序列测定以及基因表达分析等分子生物学技术是 20 世纪 80 年代才开始广泛应用的分析手段。近年来,有关酚氧化酶(Phenoloxidase, PO)的分子生物学研究也取得了很大进展。在脊椎动物中,已知酪氨酸酶 DNA 和 cDNA 序列的动物有:人、小鼠、鸡、蛙和青鳉鱼^[1]。小鼠酪氨酸酶是编码 533 氨基酸的蛋白质,其中含有信号肽和 6 个糖基化位点。与蜘蛛血蓝蛋白的亚基进行序列比较,发现有两个序列保守区,其中一个为铜结合位点^[2]。从鸡胚的视网膜色素上皮中克隆的酪氨酸酶含有 9 个糖基化位点和 3 个跨膜域,与小鼠和人酪氨酸酶氨基酸序列的一致性分别为 72% 和 73%,铜结合位点的组氨酸和半胱氨酸也是保守的^[3]。由日本池蛙酪氨酸酶 cDNA 推导的氨基酸序列与小鼠和人的酪氨酸酶显示高度同源性。在相应位点也包含可能的糖基化位点和保守的半胱氨酸。在 N-末端和 C-末端分别有两个疏水区,这两个区可能是信号肽和跨膜域。铜的结合位点在这 3 个品种以及 *Neurospora crassa*, *Streptomyces antibioticus* 和 *S. glaucescens* 中都是高度保守的^[1]。

粗略地说,脊椎动物的酪氨酸酶在结构上可分成 3 个区域,其中中间的区域为铜结合位点,该区域为酪氨酸酶的保守区(图 1)。

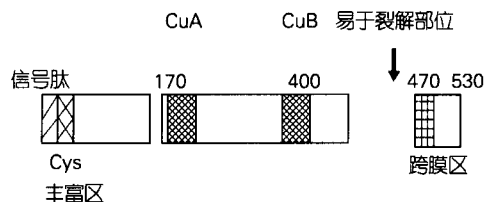


图 1 脊椎动物酪氨酸酶的域结构

酪氨酸酶序列最显著的特征是两个被称为 CuA 和 CuB 的铜结合位点。该活性位点含有一对铜离子,每一个铜离子都与 3 个保守的组氨酸残基结合。这对铜离子是酪氨酸酶与分子氧和它的酚类底物相互作用的部位。酪氨酸酶 N-端另一个有趣的区域是位于信号肽之后的一小段半胱氨酸丰富区,它在植物和动物的酪氨酸酶中都是保守的。半胱氨酸参与二硫键的形成,能够稳定蛋白质的结构。

在无脊椎动物中,4 种具有代表性的节肢动物 (*Bombyx mori*, *Manduca sexta*, *Drosophila melanogaster*, *Pacifastacus leniusculus*) 酚氧化酶原 (Prophenoloxidase, proPO) 的 cDNA 已被克隆出来^[4-7],这些 cDNA 序列使人们第一次能够对 PO 的初级结构进行分析。Aspan 等发现:螯虾 proPO 中含有两个公认的铜结合位点。原子吸收显示:每个 PO 分子中含有两个铜原子,组氨酸残基的位置非常保守,6 个组氨酸残基分布在两个铜原子周围。螯虾 proPO 的两个铜结合位点 CuA 和 CuB 与节肢动物血蓝蛋白的相应位点具有广泛的相似性。因此,螯虾的 PO 更相似于血蓝蛋白而不是酪氨酸酶。但是,除了铜结合位点外,proPO 与血蓝蛋白或其它含铜的蛋白质之间几乎没有相似的序列。

蚕的 proPO 是异源二聚体蛋白。Kawabata 等^[7]克隆了其两个亚基的 cDNA 序列,并推导出其相应的氨

第一作者:李国荣,出生于 1964 年,博士,副教授,目前在研项目:山东省科委“通过核移植技术构建转 t-PA 基因小鼠”,通信地址:山东师范大学生物系 250014, E-mail: liguorong66@hotmail.com

收稿日期:2002-11-28;修回日期:2003-02-18

氨基酸顺序。两个亚基的氨基酸序列的相似性为 51%，与节肢动物血蓝蛋白具有明显的同源性。亚基 1 与 *Eurypeima californicum* 血蓝蛋白 A, D, E 链的同源性为 34% ~ 39%；与龙虾 *Panulirus interruptus* 血蓝蛋白 A 链的同源性为 29%；与 *Limulus polyphemus* 血蓝蛋白亚基 II 的同源性为 37%^[8]。亚基 2 与 *E. californicum* 血蓝蛋白 A, D, E 链的同源性也高达 34% ~ 38%；与龙虾 *P. interruptus* 血蓝蛋白 A 链的同源性为 29%；与 *L. polyphemus* 血蓝蛋白亚基 II 的同源性为 36%。proPO 氨基酸序列显示同源性最显著的区域是与节肢动物血蓝蛋白对应的 CuA 和 CuB 区。proPO 6 个与 Cu 螯合的组氨酸残基与龙虾血蓝蛋白的铜结合配基完全一致。

果蝇 proPO 的 cDNA 序列由 2 294 bp 组成^[6]。其中, 5'-端非翻译区为 13 bp, 中间的 2 070 bp 编码开放阅读框的 690 个氨基酸残基, 3'-端非翻译区为 211 bp。由此推导的氨基酸序列的氨基末端缺乏信号肽, 氨基酸 200 ~ 248 和 359 ~ 414 为铜结合位点, 它与节肢动物血蓝蛋白的相应位点有高度的同源性。其中, 公认的铜结合配基即 6 个组氨酸残基的排列完全相同。另一方面, 果蝇 proPO 与软体动物血蓝蛋白之间序列的相似性很低, 与脊椎动物酪氨酸酶序列的相似性也极差。有趣的是, 果蝇的 proPO 与昆虫的储存蛋白显示出一定的同源性, 尽管储存蛋白没有结合铜的能力。

在 *M. sexta* 中, proPO 的 cDNA 序列含有 2 466 bp, 包括多聚腺苷酸化区和 poly(A) 的尾巴。它编码 695 个氨基酸的蛋白质, 不含有信号肽序列^[4]。*M. sexta* 的 proPO 序列显示出与其它节肢动物 proPO 的高度一致性^[5, 6], 尤其是与蚕 proPO-2 的一致性高达 77%^[7], 与 proPO-1 序列的一致性为 48%, 与果蝇和螯虾 proPO 的一致性分别为 44% 和 39%。

这 4 种节肢动物的共同特性是两个铜结合位点 CuA 和 CuB 与节肢动物血蓝蛋白的相应位点具有广泛的相似性, 而与脊椎动物酪氨酸酶铜结合位点的相似性很低。昆虫 PO 与脊椎动物酪氨酸酶在结构上的不相似以及它们参与多种反应(尤其是硬化反应)的事实说明: 昆虫保留酚氧化酶的名称是非常正确的。另外, *M. sexta* 的 proPO 蛋白序列中含有一小段与 α -巨球蛋白的硫醇酯和脊椎动物补体蛋白 C₆ 和 C₄ 相似的序列^[4]。该区域的蛋白水解参与巨球蛋白或补体蛋白与其它蛋白之间共价键的形成。尽管还不知道 PO 中是否确实存在硫醇酯, 但是, 这种相似的序列对

于解释 PO 参与血细胞的表面附着、凝集和粘着特性有一定帮助。

所有的酚氧化酶原都含有两个功能性的铜结合位点。节肢动物的 PO 含有与节肢动物血蓝蛋白 CuA 和 CuB 的相应位点^[6], 它与节肢动物血蓝蛋白、hexamerin、arylphorin 和螳螂的 Cr-PI 过敏原(allergen)有相似的序列, 似乎是同源的蛋白质。相比之下, 酪氨酸酶与软体动物血蓝蛋白的同源关系更为密切^[9]。在无脊椎动物中, 第一个非节肢动物的酪氨酸酶 cDNA 序列是从海鞘 *Halocynthia roretzi* 中克隆出来的^[10]。与节肢动物的 proPO 相比, 海鞘的酪氨酸酶更类似于脊椎动物的酪氨酸酶。它有一个开放的阅读框, 其氨基酸序列与脊椎动物酪氨酸酶有 36% ~ 39% 的相似性。海鞘 proPO 基因首先在早期神经胚位于神经板的两个色素前体细胞中表达, 然后在尾芽期胚胎脑中的两个含黑色素的细胞中表达。与节肢动物的 proPO 不同, 海鞘的酪氨酸酶具有类似脊椎动物的信号肽和跨膜域。

血蓝蛋白与 PO 不同, 是一种含铜的运输氧的蛋白质, 其功能是作为氧的载体而不是单加氧酶。它是许多甲壳动物血淋巴的主要蛋白质, 占血淋巴总蛋白的 90% 以上。在节肢动物的甲壳类、螯肢动物和多足类 3 个纲中, 血蓝蛋白以细胞外寡聚体的形式存在, 与软体动物血蓝蛋白的结构不同但功能相似。邓杰内斯蟹(*Dungeness*) *Cancer magister* 具有典型的节肢动物血蓝蛋白, 它由 6 个异源亚基组成, 每个亚基的分子量为 82 ~ 67 ku, 组装成两个不同的分子群, 16S 和 25S 两种六聚体, 它们并不处于相互的结合-分离平衡之中。每一个亚基含有一个双核铜位点, 能可逆地与一分子氧结合^[7]。

节肢动物血蓝蛋白的 CuA 和 CuB 区是非常相似的, 即 CuA 区的氨基酸序列与 CuB 区类似。软体动物血蓝蛋白只有在 CuB 区显示与节肢动物血蓝蛋白的高度相似性^[11]。与此相反, 软体动物血蓝蛋白的 CuA 区和 CuB 区分别与酪氨酸酶的 CuA 区和 CuB 区相似, 并且在每一个铜结合位点, 除了 3 个组氨酸外, 还有几种氨基酸也是保守的, 这更加说明了软体动物血蓝蛋白和酪氨酸酶之间结构的相似性。

许多原始的节肢动物, 如马蹄蟹、蜘蛛和甲壳动物, 都依靠血淋巴中的血蓝蛋白来运输氧。据作者所知: 昆虫的血淋巴中并不含有血蓝蛋白。昆虫进化形成了复杂的气管系统可直接把空气中的氧运输到组织。因此, 人们一般认为昆虫不再需要血蓝蛋白。这也

就是血蓝蛋白从昆虫的血淋巴中消失的原因。昆虫虽然缺乏功能性的血蓝蛋白,但含有另一种血淋巴蛋白-hexamerin。其四级结构与六聚体的血蓝蛋白相似,因为一些 hexamerin 在幼体时期浓度很高,在变态或成体的非饲养时期形成新的身体结构(如角质),故有人把它称作幼体血清蛋白或储存蛋白。arylphorin 也是一种储存蛋白。尽管昆虫的这些血淋巴蛋白缺乏双核铜结合位点,但基于它们与血蓝蛋白序列的相似性、亚基的大小、六聚体的形状和保守的外显子-内含子边界,人们推测含铜的血蓝蛋白和无铜的 hexamerin 有一个共同的祖先^[7]。

1999年, Terwilliger^[12]等从蟹(*Cancer magister*)中分离纯化出了节肢动物 proPO/血蓝蛋白基因家族中的另一个成员 Cryptocyanin。Cryptocyanin 是血淋巴中一种六聚体蛋白,其分子的氨基酸序列、大小和结构与节肢动物血蓝蛋白非常相似。Cryptocyanin 与昆虫的 hexamerin 也相似,都缺乏铜以及 CuA 和 CuB 结合位点的组氨酸,不能结合氧,也没有 PO 的活性。Cryptocyanin 在血淋巴中的浓度与蜕皮循环密切相关,在蜕皮期间其含量高于血蓝蛋白的水平。因此,它也是一种与蜕皮有关的蛋白,参与新的外骨骼的形成。据推测:Cryptocyanin 是由血蓝蛋白的基因复制产生的。

由上述 4 种已克隆的节肢动物 proPO 的分子生物学研究结果并结合已有的实验证据不难看出:所有的 PO 与节肢动物血蓝蛋白的 CuB 序列具有同源性,而第一个铜结合位点则与节肢动物血蓝蛋白的 CuA 序列不同;软体动物血蓝蛋白与节肢动物 proPO 不同,其第一个铜结合位点(CuA)与酪氨酸酶(包括细菌/真菌的酪氨酸酶以及脊椎动物的酪氨酸酶)的第一个铜结合位点序列非常相似,但与第二个铜结合位点(CuB)不同。Lerch 和 Germann 设想存在一个含有铜结合位点的祖先单核铜结合蛋白,该位点对应于酪氨酸酶基因家族成员的第二个铜结合位点(CuB)。他们假定:对于节肢动物的血蓝蛋白,通过该位点的复制而产生了双核的铜结合蛋白;对于软体动物的血蓝蛋白和 PO,发生了基因融合事件,在祖先的基因上增加了特殊的第一个铜结合位点基因(CuA)。该假说被 van Holde 进一步提炼,他建议细菌/真菌的酪氨酸酶在含有 CuA 和 CuB 结合位点的基因家族中可能是原始的,脊椎动物的酪氨酸酶和软体动物的血蓝蛋白随后从这些基因中分支出去。在软体动物中,由原始的基因复制几次,形成现存软体动物中看到的多聚体血蓝蛋白;而在脊椎动物中,通过原始基因的复制而形

成酪氨酸酶基因家族中的各种成员。

参考文献

- 1 Takase M, Miura I, Nakata A, et al. Cloning and sequencing of the cDNA encoding tyrosinase of the Japanese pond frog. *Rana nigromaculata*. *Gene* 1992, 121: 359-363
- 2 Muller G, Ruppert S, Schmid E, et al. Functional analysis of alternatively spliced tyrosinase gene transcripts. *EMBO J*, 1988, 7: 2 723-2 730
- 3 Mochii M, Iio A, Yamamoto H, et al. Isolation and characterization of a chicken tyrosinase cDNA. *Pigment Cell Res*, 1992, 5: 162-167
- 4 Hall M, Scott T, Sugumaran M, et al. Proenzyme of *Man-duca sexta* phenoloxidase: purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 7 764-7 768
- 5 Asspan A, Huang T S, Cerenius L, et al. cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus lenius-culus* and its activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 939-943
- 6 Fujimoto K, Okino N, Kawabata S, et al. Nucleotide sequence of the cDNA encoding the proenzyme of phenol oxidase A1 of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 7 769-7 773
- 7 Kawabata T, Yasuhara Y, Ochiai M, et al. Molecular cloning of insect pro-phenol oxidase: a copper-containing protein homologous to arthropod hemocyanin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 7 774-7 778
- 8 Linzen B, Soeter N M, Riggs A F, et al. The structure of arthropod hemocyanins. *Science*, 1985, 229: 519-524
- 9 Durstewitz G, Terwilliger N B. cDNA cloning of a developmentally regulated hemocyanin subunit in the crustacean *Cancer magister* and phylogenetic analysis of the hemocyanin gene family. *Mol Biol Evol*, 1997, 14: 266-276
- 10 Sato S, Masuya H, Nukamakunai T, et al. Ascidian tyrosinase gene: its unique structure and expression in the developing brain. *Dev Dynamics*, 1997, 208: 363-374
- 11 Lang W H, Van Holde K E. Cloning and sequencing of *Octopus dofleini* hemocyanin cDNA: Derived sequences of functional units Ode and Odf. *Proc Natl Acad Sci*, 1991, 88: 244-248
- 12 Terwilliger N B, Dangott L, Ryan M. Cryptocyanin, a crustacean molting protein: Evolutionary link with arthropod hemocyanins and insect hexamerins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 2 013-2 018

(本文编辑:刘珊珊)