

苯丙氨酸解氨酶与其在重要次生代谢产物 调控中的作用研究进展

张宽朝, 金青, 蔡永萍, 林毅
(安徽农业大学生命科学学院, 安徽合肥 230036)

摘要: 苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL, E.C.4.3.1.5)作为植物次生代谢特别是苯丙烷途径的关键酶,具有重要的生理意义。综述了PAL的存在与分布、分离纯化、酶学性质、三维结构和作用机制,并分析了苯丙氨酸解氨酶与植物重要次生代谢产物生产的关系,以期进一步丰富次生代谢产物的调控理论,为PAL在次生代谢产物生产中发挥作用提供基础数据。

关键词: 苯丙氨酸解氨酶; 苯丙烷途径; 次生代谢产物

中图分类号: Q814 文献标识码: A

Research Progress of PAL and Its Control Function of Important Secondary Metabolites

Zhang Kuanchao, Jin Qing, Cai Yongping, Lin Yi

(School of Life Science, Anhui Agriculture University, Hefei 230036)

Abstract: PAL, a critical enzyme in secondary metabolism of plants, was the first and key enzyme of the phenyl propanoid sequence. It has great influence on plant physiological function. In this paper, the PAL's distribution, separation and purification, basic characters, three-dimensional structure, mechanism were reviewed. Meanwhile, the progresses of the research on PAL in secondary metabolites were especially emphasized, in order to enrich the mechanisms of regulation to secondary metabolism, and provide some references for its advanced research.

Key words: phenylalanine ammonia-lyase, phenyl propanoid sequence, secondary metabolites

苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL, EC4.3.1.5)是连接初级代谢和苯丙烷类代谢、催化苯丙烷类代谢第一步反应的酶,是苯丙烷类代谢的关键酶和限速酶,也是苯丙烷类代谢途径中研究最多的酶,是催化直接脱掉L-苯丙氨酸上的氨而生成反式肉桂酸的酶^[1]。

莽草酸途径产生的L-苯丙氨酸,经苯丙氨酸解氨酶解氨作用生成反式肉桂酸,而进入苯丙烷类代谢途径,香豆酸、阿魏酸、芥子酸等中间产物,可以进一步转化为香豆素、绿原酸,也可以形成CoA酯,再进一步转化为类黄酮、木质素、生物碱等^[2,3]。因此,苯丙氨酸解氨酶在植物色素形成、在植物细胞分化和木质化过程、参与植物抗病作用与抗虫害作用、参与植物抗逆境作用

以及人体抗病作用等方面的具有重要意义^[3]。

1 PAL的分布

PAL存在于所有绿色植物中,目前已从水稻^[4]、小麦^[5]、番茄^[6]、甘蓝型油菜^[6]等多种植物中得到分离纯化。真菌和藻类细胞中也有存在^[7]。研究证明细菌也存在PAL,如在*E.coli*中就发现有PAL蛋白。对于动物体内是否存在PAL,目前尚无定论。

在细胞水平上,植物体内的PAL主要分布在表皮下的细胞和微管组织细胞中。组织印迹显示PAL mRNA常出现在表皮和微管束附近的组织细胞中。在亚细胞水平上,PAL主要分布于细胞质和线粒体、叶绿体与乙醛酸体等细胞器。免疫细胞化学研究显示PAL合成于栅栏细胞和海绵细胞,主要在细胞质和叶绿体内^[8]。

基金项目: 安徽省教育厅重点项目(2006KJ054A); 安徽省教育厅人才基金。

第一作者简介: 张宽朝,男,1981年出生,安徽省涡阳县人,硕士研究生,讲师,研究方向:生物化学和分子生物学。通信地址:230036 安徽省合肥市安徽农业大学生命科学学院生物化学教研室。Tel:0551-5786907, E-mail: zhangkch1980@126.com。

通讯作者: 林毅,1957年出生,男,教授,博士生导师。

收稿日期: 2008-08-29, 修回日期: 2008-09-24。

2 PAL 的分离纯化及定量测定

PAL 作为诱导性酶,材料中含量较低,稳定性差,分离纯化制备较困难。酶蛋白表面连接的多糖及纯化过程中肽链自发断裂,多年来一直困扰 PAL 酶的纯化并影响了对酶组成与结构的认识。目前,常用的分离纯化方法包括沉淀法、离子交换层析法、亲和层析法以及其它层析法等^[9]。M Jason MacDonald 等总结发现,不同人员在进行 *Rhodorula* PAL 的分离纯化时结果存在很大的差异,纯化倍数最大有 6 倍的差距,而产率也可达到近 2 倍差距,这可能是由于植物组织中多分子亚基的存在或者是纯化过程中蛋白水解所致^[10]。

PAL 的活性可通过测定酶促反应终止时 L-Phe 的减少量或者产物 t-CA 的生成量来表示,而通常 PAL 的活性是利用紫外分光光度计法测定产物 t-CA 在 290 nm 处的吸收值来表示^[10]。

3 PAL 的基本酶学特性

现普遍认为, PAL 酶蛋白是具有相同亚基的四聚体,成双的单体形成一个带有单一活性中心的原体(protomer),一般分子量在 220~330 kDa 之间。不同来源的 PAL 分子量不同。同种生物 PAL 采用不同的方法测得的分子量也有所不同。值得注意的是, PAL 亚基间的结合是非常牢固的。要把 PAL 的亚基分离开来需要高浓度的尿素、氯化胍或 SDS- 巯基乙醇。因此,生物体内的 PAL 是比较稳定的。

不同的植物,其 PAL 的氨基酸组成不同。如水稻中的 PAL 酸性成分少于小麦、玉米、马铃薯,而中性成分高于以上 3 种植物^[4]。不同来源的 PAL 最适 pH 在 8.0~9.5 之间,水稻中 PAL 最适 pH 偏碱,这和其氨基酸组成相一致,见表 1。

表 1 不同来源的 PAL 的物理和动力学特征

来源	最适 pH	Km/(mmol/L)	分子量/kD
红酵母 ^[11]	8.5	0.387	320
无壳葫芦籽黄化苗 ^[12]	8.5	0.026	280
鹰嘴豆 ^[13]	9.4	0.18	205
水稻黄花苗 ^[1]	9.2	0.594	230
小麦黄花苗 ^[1]	8.8	0.0625, 0.031	280
甘蓝型油菜荚果 ^[6]	8.4	1.01, 0.778	184

除个别生物如粘红酵母的 L-PAL 在底物为 NH₄⁺ 时的酶促反应符合经典的米氏方程外,大多数生物的 PAL 动力学曲线并不遵循米氏方程。但 1985 年, Bolwell 等采用两次聚焦色谱从菜豆中分得 4 种 Mr 相同、pI 不同的 PAL 同工酶,均表现出典型米氏动力学特征,而未经分离的同工酶混合物却表现为典型的负协同变构酶动力学特征^[14]。各种来源的 PAL Km 不同,

为 10⁻⁴~10⁻² mmol/L 之间,且有的存在两个 Km。

4 PAL 的三维结构

M Jason MacDonald 等总结了 Calabrese 等测定的 *Rhodosporidium toruloides* PAL 的三维结构^[10]。*Rhodosporidium toruloides* PAL 是 1 个每个亚单元包含 716 个残基的同源四聚体,亚基分子量为 76.88kDa,每个亚基与两个别的亚基头尾相连,形成“海马”状,所以增大了邻近亚基的相互作用,产生了 1 个四聚物。四聚物组装形成一个 4 个连位巯基丙氨酸(残基 140, 455, 467 和 530)的簇团。PAL 的主体结构与 HAL 具相似的折叠,有 1.4A 的均方根偏差。PAL 的长度可变的近于平行的 α -螺旋有 1 个中央核心区。PAL 最长的螺旋含有 61 个残基(505~565),几乎跨越了单体的整个长度。只有 1 个 β -折叠的断面长于 3 个残基(231~237 和 240~246 残基链),它存在于紧邻活性中心的漏斗形区域。PAL 不同于 HAL 的在于它具有额外的 215 个残基,它们中的大部分位于 N-末端和 C-末端区域的伸展部分。

5 PAL 催化作用机制

PAL 催化作用机制的研究主要经历了 3 个阶段^[15]: (1) 1970 年, Hason 和 Havir 率先提出米切尔加成反应机理:即去氢丙氨酸(DHA)为 PAL 的活性中心, PAL 反应机理方案的关键步骤是 L-苯丙氨酸的氨基经由米切尔加成到 DHA 的 β 位。(2) 1994 年, Schuster 和 Retey 提出了第 2 种傅氏反应机理,即辅基 DHA 以傅氏(Friedel-Crafts)反应方式,攻击 L-苯丙氨酸芳环邻位,造成 C⁺,使 β 位质子被酸化,从而有助于由酶催化碱基的去除作用,在氨的前 -S- 质子消除作用去除后,该环再度芳构化,并重新产生辅基。(3) 随着化学和分子生物学实验证据的提出,主要基于 PAL 和 HA 具有高度同源性,及其对“姐妹”酶 HAL 的 X-射线结构分析, 2004 年杨顺楷等人发现催化性的亲电试剂并非 DHA,而是 3,5-二氢-5-次甲基-4H-咪唑-4-酮(MIO)。

6 PAL 在重要次生代谢生产中的应用

经过苯丙烷代谢途径的许多次生代谢产物是天然的对许多重大疾病有独特疗效的活性成分,在医疗具有不可替代的作用。苯丙烷代谢途径不同去向,对次生代谢产物积累及生理作用产生巨大的影响。而 PAL 是植物次生代谢特别是苯丙烷代谢途径中的关键酶,因此,探讨 PAL 与黄酮、生物碱等重要次生代谢产物积累的关系,有目的的通过 PAL 的调控富集次生代谢产物成为当前研究的重要领域。

6.1 PAL 调控黄酮类化合物合成的研究进展

黄酮类化合物(flavonoid)是广泛存在于自然界的

一大类化合物,在高等植物体中分布较多。黄酮类化合物广泛存在于自然界中,是一类重要的天然有机化合物,一般黄酮类化合物具有抗肝脏毒、抗炎、抗菌、解痉等生物活性^[16]。

唐宇^[17](1998)对荞麦的研究表明,荞麦中黄酮化合物的形成主要受苯丙氨酸解氨酶(PAL)活力的调控:荞麦幼苗及幼苗不同器官中黄酮含量随着苯丙氨酸解氨酶活力变化而变化,而X射线处理可增强荞麦幼苗中苯丙烷类代谢途径,致使黄酮含量提高。刘金福等^[18]在对苦荞进行研究时发现,苦荞发芽过程中通过改变温度、光照等条件和喷洒乙烯利处理,能够明显刺激次级代谢产物黄酮的生成和提高苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性,PAL活性与黄酮含量变化基本上是相符的,PAL活性升高,黄酮合成量也增加。房建军等^[19]对银杏细胞培养的研究表明,黄酮的积累在细胞生长对数期内增加,于15天达最高峰,在黄酮积累的过程中PAL活性也呈增加趋势。田向军等^[20]研究灌浆期小麦叶片中黄酮类化合物时发现,UV-B胁迫条件下,黄酮类化合物含量明显上升,而胁迫解除后,其含量下降,与对照组间差异逐渐减小,合成黄酮类化合物的关键性酶-苯丙氨酸解氨酶活性的变化也表现出大致相同的趋势。

6.2 PAL 调控紫杉醇合成的研究进展

紫杉醇是从红豆杉树皮中分得的具有八元碳环的三环二萜成分,有良好的抗白血病、抗肿瘤活性^[16]。

张长平等^[21,22]在南方红豆杉细胞悬浮培养过程中,于指数生长期的末期加入真菌诱导子(尖孢镰刀菌的胞壁组分提物),结果表明,PAL的活力得到提高,萜类产物中紫杉醇类的生物合成均得到了加强,紫杉醇的合成被加强,产量得到了显著提高,达到了对照组的5倍左右。

张长河等^[23]研究了Chitosan(聚氨基葡萄糖)对红豆杉悬浮培养细胞PAL(苯丙氨酸解氨酶)活性及Taxol(紫杉醇)生物合成的影响,结果表明Chitosan使红豆杉细胞PAL活性增强,并伴随紫杉醇含量的提高,Chitosan浓度为100~1000 mg/L时对红豆杉细胞PAL活性有明显的诱导作用,且诱导作用随浓度的增加而增强,在诱导作用下PAL活性在16 h达到峰值;Chitosan浓度在100 mg/L时对红豆杉细胞的生长基本无抑制作用,增产效果最显著(约为对照组的10倍),Chitosan可作为Taxol合成的诱导子。

余龙江等研究表明^[24],加入真菌诱导子后,苯丙氨酸解氨酶活性相应提高,紫杉醇含量随着PAL活性上升而相应提高且以中期为初始周期时相的细胞诱导后

PAL活性最高,其紫杉醇含量也最高,暗示PAL活性迅速升高,可作为与紫杉醇是否被诱导大量合成的生理指标。

李春等^[25]对真菌寡聚糖诱导悬浮培养南方红豆杉细胞生产紫杉醇的体系研究发现,加入寡聚糖后,细胞防御系统开启,苯丙烷类代谢途径的关键酶PAL的活性在1 h后急速提高,目的产物紫杉醇在诱导后72 h达到峰值,比对照组提高了6倍。

李家儒等^[26]在红豆杉细胞悬浮培养20天(指数生长期末)时加入30 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 ,结果使紫杉醇含量达到24.88 $\mu\text{g/g}$,并发现苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性增强,促进了胞内苯甲酸(紫杉醇侧链合成前体)的形成,进而促进了紫杉醇的合成。

梅兴国等^[27]的试验证实,SA可提高苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性,且20 mg/LSA对紫杉醇的促进效果最明显,此时紫杉醇含量是对照的13倍。

王艳东等^[28]研究表明甲基茉莉酮酸(MJ)明显抑制了南方红豆杉细胞活力,对细胞的初生代谢造成了不良影响;MJ可促使细胞从初生代谢向次生代谢提前转化,且可增强次生代谢的进行,诱导PAL(苯丙氨酸解氨酶)活性增强,这也是MJ促进紫杉醇产量提高的原因之一。

6.3 PAL 调控生物碱合成的研究进展

生物碱是指天然产的一类含氮的有机化合物,且大多具有生物学活性,如:长春花中的长春碱具有抗癌活性,麻黄中的麻黄碱具有止喘作用^[16]。

Jian Zhao等^[29]研究表明,外源联合使用苹果酸和海藻酸钠诱导长春花悬浮培养细胞,可使苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性增高,同时产生最高量的长春花碱和大量的阿玛碱。Moreno-Valenzuela O.A.等^[30]的研究也表明,浸解酶浓度的增加可以导致长春花发根叫咪生物碱和香豆素积累的增加,而其中1%的浸解酶处理发根可以导致PAL的酶活增加4倍。

6.4 PAL 调控红厚壳素等其他次生代谢产物合成的研究进展

殷俊等^[31]用纤维素酶降解人参细胞壁制备的激发子刺激人参细胞,结果表明,适当浓度激发子的处理会诱导人参细胞内人参皂苷含量和苯丙氨酸解氨酶活力的升高。

崔堂兵等^[32]研究表明,胡桐CR2细胞悬浮培养过程中,苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性上升后红厚壳素产量即增加。加入真菌诱导子后,PAL活性与红厚壳素产量呈一定的正相关。以PAL抑制物降低PAL活性后,红厚壳素产量也降低;诱导物与抑制物同时加入,PAL活

性与红厚壳素产量均界于诱导物处理与未处理之间。

徐茂军等^[13]研究外源 NO 对金丝桃悬浮细胞生长及金丝桃素生物合成的影响, 试验结果表明, 在 15.0 mmol/L 的 SNP 处理下, 金丝桃悬浮细胞中的苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性显著升高, 推测 NO 可能通过触发金丝桃悬浮细胞的防卫反应, 激活了细胞中金丝桃素的生物合成途径。

李伟等^[14]研究显示结果表明, 培养温度和愈伤组织的外植体来源均影响狭叶红景天红景天甙的含量和苯丙氨酸解氨酶、肉桂酸-4-羟化酶和酪氨酸解氨酶的酶活力, 在 24 °C 和 4 °C 温度条件下, 相同外植体来源的愈伤组织中和相同培养温度条件下的茎和叶 2 种不同来源外植体的愈伤组织中, 红景天甙含量和 3 种代谢酶活力之间均存在显著性差异。

综上, 进一步开展对 PAL 酶基因作用机制、表达模式等的研究, 强化 PAL 在生物体内特定时间特定部位的表达, 实现对苯丙烷代谢途径的有效调控, 大量富集特定目的次生代谢产物, 提高特定次生代谢产物(比如银杏叶黄酮、紫杉醇、生物碱)的含量, 这必将成为次生代谢产物调控研究的新焦点。

参考文献

- [1] Amrita Kumar, Brian E Ellis. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry. Structure, expression, and evolution [J]. *Plant Physiology*, 2001, 127(1): 230-239.
- [2] 欧阳光察, 薛应龙. 植物苯丙烷类代谢的生理意义及其调控[J]. *植物生理学通讯*, 1988, 24(3): 9-16.
- [3] 江昌俊, 余有本. 苯丙氨酸解氨酶的研究进展(综述) [J]. *安徽农业大学学报*, 2001, 28(4): 425-430.
- [4] 欧阳光察, 应初衍, 沃绍根, 等. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究. VI. 水稻、小麦 PAL 的纯化及基本特性 [J]. *植物生理学报*, 1985, 11(2): 204-214.
- [5] 荣瑞芬, 郭堃, 厉重先, 等. 紫外照射诱导采后番茄苯丙氨酸解氨酶的分选纯化[J]. *北方园艺*, 2007, (12): 1-4.
- [6] 姜红林, 梁颖. 甘蓝型油菜苯丙氨酸解氨酶的分选纯化与性质研究[J]. *中国农学通报*, 2006, 22(7): 282-286.
- [7] Hanson K R, Havir E A. Phenylalanine Ammonia-Lyase [J]. *The Biochemistry of Plants*, 1981, 7: 578-621.
- [8] Laura Jane M. Santiago, Ricardo Louro, Dulce De Oliveira. Compartmentation of phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase in leaves of *Phyllanthus tenellus* Roxb. and their induction by copper sulphate[J]. *Annals of Botany*, 2000, 86(5): 1023.
- [9] 赵健身, 杨顺楷. 苯丙氨酸解氨酶[J]. *天然产物研究与开发*, 1993, 5(4): 47-56.
- [10] M Jason MacDonald, Godwin B D'Cunha. A modern view of phenylalanine ammonia lyase [J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 2007, 85, 3: 273-282.
- [11] 江柯, 卢涛, 赵德立, 等. 红酵母苯丙氨酸解氨酶的分选纯化及性质研究[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2004, 41(4): 865-868.
- [12] 孟延发. 无壳葫芦籽苯丙氨酸解氨酶的纯化及其基本性质[J]. *兰州大学学报(自然科学版)*, 1991, 27(2): 134-139.
- [13] 孟延发, 辛嘉英. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究: 1. 鹰嘴豆 PAL 的纯化及其基本性质 [J]. *兰州大学学报: 自然科学版*, 1990, 26(3): 109-113.
- [14] Bolwell, G.P., Bell, J.N., Cramer, C. L., et al. L-phenylalanine Ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris* [J]. *Eur. J. Biochem*, 1985, 149: 11
- [15] 杨顺楷, 杨亚力, 杨维力. 苯丙氨酸解氨酶(PAL, EC4.3.1.5)反应机理研究新进展[J]. *生物加工过程*, 2004, 2(4): 1-5.
- [16] 吴立军. 天然药物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 6.
- [17] 唐宇. 荞麦中苯丙氨酸解氨酶活力与黄酮含量的关系[J]. *绵阳经济技术高等专科学校学报*, 1998, 15(1): 9-12.
- [18] 刘金福, 李晓雁, 孟蕊. 苦荞发芽过程中促进黄酮合成的因素初探[J]. *食品工业科技*, 2006, 27(10): 106-108
- [19] 房建军, 阙国宁, 韩一凡. 银杏细胞培养中影响黄酮积累量的几个因素[J]. *林业科学研究*, 2006, 19(1): 51-53
- [20] 田向军, 邱宗波, 刘晓, 等. 增强 UV-B 辐射对小麦叶片黄酮类化合物日变化的影响[J]. *环境科学学报*, 2007, 27(3): 516-521.
- [21] 张长平, 孙安慈, 元英进. 真菌诱导子对悬浮培养南方红豆杉细胞态势及紫杉醇合成的影响[J]. *生物工程学报*, 2001, 17(4): 436-440.
- [22] 张长平, 李春. 真菌诱导子对悬浮培养南方红豆杉细胞次生代谢的影响[J]. *化工学报*, 2002, 53(5): 498-502.
- [23] 张长河, 余龙江, 梅兴国, 等. Chitosan 对红豆杉 PAL 及 Taxol 合成的影响[J]. *华中理工大学学报*, 1999, 27(4): 104-106.
- [24] 余龙江, 蔡永君, 兰文智. 红豆杉细胞周期时相与紫杉醇诱导合成的关系初探[J]. *武汉植物学研究*, 2001, 19(6): 509-512.
- [25] 李春, 元英进, 马忠海, 等. 寡聚糖诱导悬浮培养南方红豆杉细胞的凋亡[J]. *植物学报*, 2002, 44(5): 598-602
- [26] 李家儒, 管志勇, 刘曼西, 等. Cu²⁺ 对红豆杉培养中紫杉醇形成的影响[J]. *华中农业大学学报*, 1999, 18(2): 117-120
- [27] 梅兴国, 张舟宁, 苏湘鄂, 等. 水杨酸对红豆杉细胞的诱导作用[J]. *生物技术*, 2000, 10(6): 18-20.
- [28] 王艳东, 路明, 元英进. 甲基茉莉酮酸对悬浮培养南方红豆杉细胞代谢的影响[J]. *中草药*, 2003, 34(1): 27-30.
- [29] Jian Zhao Wei-Hua Zhu, Qiu Hu. Enhanced catharanthine production in *catharanthus roseus* cell cultures by combined elicitor treatment in shake flasks and bioreactors [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, 28(7-8): 673-681.
- [30] Moreno-Valenzuela O.A., Monforte-Gonzalez M., Munoz-Sanchez J. A., et al. Effect of macerozyme on secondary metabolism plant product production and phospholipase C activity in *Catharanthus roseus* hairy roots[J]. *Journal of plant physiology*, 1999, 155(4/5): 447-452.
- [31] 殷俊, 刘超, 管培珠, 等. 纤维素酶降解人参细胞胞壁产生的激发子诱导人参培养细胞的反应[J]. *实验生物学报*, 1999, 32(3): 301-311.
- [32] 崔堂兵, 罗焕亮, 郭勇, 等. 胡桐悬浮培养细胞中苯丙氨酸解氨酶活性与红厚壳素产量的关系[J]. *植物生理学通讯*, 2004, 4(6): 702-704.
- [33] 徐茂军, 董菊芳, 张刚. NO 对金丝桃悬浮细胞生长及金丝桃素生物合成的促进作用研究[J]. *生物工程学报*, 2005, 21(1): 66-70.
- [34] 李伟, 杜桂森, 黄勤妮. 狭叶红景天愈伤组织中红景天甙含量及相关代谢酶活力的研究[J]. *西北植物学报*, 2005, 25(8): 1645-1648.